

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**



**KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE**

**STUDIJNÍ OBOR: FARMACIE**

**Sublingvální aplikace léčiv 6**

**Sublingual drug delivery 6**

**Josef Janečka**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, 2012

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Děkuji vedoucímu práce doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za jeho spolupráci, nápady a připomínky při vypracování této diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Petru Vrbatovi a Mgr. Moridu Mahmoudi Majdovi za asistenci při experimentální práci, Mgr. Pavlu Berkovi za konzultace související se statistickým zpracováním dat a Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za umožnění práce na spektrofluorometru i odborné konzultace.

Za podporu po čas celého studia patří velký dík i mé rodině.

# OBSAH

OBSAH.....	4
ABSTRAKT .....	5
ABSTRACT.....	6
1 ÚVOD.....	7
2 ZADÁNÍ PRÁCE.....	8
3 TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE.....	9
3.1 Sublingvální podání léčiv .....	9
3.2 Zásadní vliv slin na sublingvální aplikaci léčiv .....	10
3.3 Propustnost sliznice úst .....	10
3.4 Vliv vrstvy hlenu na permeaci částic .....	11
3.5 Nanočástice PD Chromeon 470.....	12
3.6 Vlákna hlenu jako překážka pohybu částic .....	13
3.7 Endocytóza .....	15
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	17
4.1 Suroviny .....	17
4.2 Přístroje .....	17
4.3 Přípravné práce .....	18
4.3.1 Příprava fosfátového pufru.....	18
4.3.2 Příprava sublingvální membrány.....	19
4.3.3 Permeační komůrka .....	19
4.4 Provedení úvodních permeačních experimentů.....	20
4.4.1 Pilotní permeační pokusy.....	20
4.4.2 Permeační pokus č. 1 (2. 5. 2011) .....	20
4.4.3 Řešení problémů spojených s měřením kalibrační křivky .....	21
4.4.4 Úprava nastavení měřicího přístroje.....	24
4.4.5 Vlastní měření kalibrační křivky pro stanovení koncentrace nanočástic.....	30
4.4.6 Permeační pokus č. 2 (23. 5. 2011) .....	32
4.4.7 Výsledky pilotních permeačních pokusů.....	33
4.5 Kalibrační křivka pro hlavní sérii měření.....	35
4.6 Hlavní sada permeací začínající (6. 10. 2011).....	38
4.6.1 Průběh permeačního pokusu .....	38
4.6.2 Měření permeačních vzorků, nestabilita slepého vzorku.....	40
5 VÝSLEDKY HLAVNÍ SÉRIE MĚŘENÍ.....	44
6 ZÁVĚR .....	48
7 LITERATURA .....	49
8 DOKUMENTACE .....	53
8.1 Vysvětlení zkratk použitých v protokolech.....	53
Protokol 1 .....	54
Protokol 2 .....	55
Protokol 3 .....	56
Protokol 4 .....	57
Protokol 5 .....	58

# ABSTRAKT

Práce v teoretické práci pojednává o fyziologických překážkách sublingvální aplikace zejména částicových nosičů, všímá si dosažených výsledků autorů, kteří se zabývali podobnou tematikou.

V experimentální části byla pro hodnocení permeability sublingvální membrány použita modifikace Franzovy difúzní cely pro horizontálně umístěné membrány, rozdělující komůrku na donorovou část a akceptorovou část. Pro výzkum byly použity mražené vepřové sublinguální membrány. Akceptorovou fází byl izotonický fosfátový pufr pH 7,4. Donorovou fází byl neupravovaný 0,5% roztok fluorescenčně značených částic PD Chromeon 470. Pro stanovení koncentrace částic v akceptorové fázi byl použit spektrofluorometr Aminco Bowman Series 2 od firmy Thermo Fisher. Pro detekci nízkých koncentrací byla použita nejvyšší citlivost přístroje a vícenásobné proměřování vzorků.

Průměrná hodnota fluxu fluorescenčně značených částic PD Chromeon 470 o velikosti 40 nm u měřených 5 komůrek během prvních 12 hodin dosáhla hodnoty  $0,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hod}^{-1}$ .

# ABSTRACT

Work in theoretical work deals with physiological barriers sublingual application of particle carriers, notes the results of authors who have dealt with similar themes.

In the experimental part was to evaluate the permeability of membranes used sublingual modified Franz diffusion cells for horizontally positioned membrane dividing the chamber of the donor and acceptor part. For the research were used frozen pork sublingual membranes. Acceptor phase was isotonic phosphate buffer pH 7.4. Donor phase was 0.5% solution of fluorescently labelled particles PD Chromeon 470. To determine the concentration of particles in the acceptor phase was used spectrofluorometer Aminco Bowman Series 2 from Thermo Fisher. To detect low concentrations was used the highest sensitivity of the device and multiple measurement of samples.

The average flux value of fluorescently labelled particles Chromeon PD 470 40 nm in size in five chambers measured during the first 12 hours of  $0,18 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{hod}^{-1}$  reached.

# 1 ÚVOD

Sublingvální cesta podání patří mezi méně používané způsoby aplikace léčivé látky, přestože pro systémové podání nabízí mnohé výhody, kterých je možno využít terapeuticky. Vstřebání řady látek je velmi rychlé a efektivní, neboť látka se vyhýbá metabolizačnímu efektu při prvním průchodu játry i působení trávicích enzymů. Prostupnost sublingvální sliznice je také poměrně pozoruhodná, jak ukazují výsledky prostupnosti peptidů a proteinů i nadějně výsledky sublingvální vakcinace.

Výzkum sublingválního podání probíhá na katedře farmaceutické technologie FaF UK pátým rokem a předkládaná práce využívá poznatků předchozího výzkumu. Zároveň dává nové podněty pro další výzkumné úkoly do budoucna. V minulých měřeních bylo zjištěno, že přes sublingvální membránu jsou in vitro schopny pronikat i různé makromolekuly. Hlavním experimentálním úkolem této diplomové práce bylo zjistit, resp. potvrdit, zda i z molekulárního pohledu obří nanočástice jsou schopné zmíněnou biologickou bariérou proniknout.

## 2 ZADÁNÍ PRÁCE

V teoretické části práce bylo úkolem nastínit základní principy sublingválního vstřebávání léčiv a uvést dostupné informace o nanočásticích Chromeon 470 použitých během pokusu.

V experimentální části práce bylo cílem především detailně pojednat problematiku experimentálního stanovení permeačních parametrů fluorescenčně značených nanočástic Chromeon 470 (Sigma-Aldrich).

Díličmi úkoly experimentu bylo:

1. vyzkoušet praktické provedení pokusu pro specifické podmínky permeace nanočástic
2. vyřešit problém stanovení nízkých hladin fluorescenčně značených nanočástic ve vzorcích
3. vytvořit kalibrační křivku pro standardy nanočástic v potřebném koncentračním rozsahu
4. provést měření permeace nanočástic za použití sady 10 permeačních komůrek, se časově odstupňovaným závěrečným odběrem 5 sublingválních membrán za účelem jejich mikroskopického pozorování
5. odebrané vzorky akceptorové fáze ze zbývajících 5 komůrek spektrofotometricky proměřit
6. získaná permeační data nanočástic Chromeonu 470 statisticky zpracovat a stanovit hodnoty fluxu



# 3 TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE

## 3.1 Sublingvální podání léčiv

S rozvojem nových technologií v oblasti lékových forem, včetně využití enzymových inhibitorů, látek zvyšující propustnost sliznic a transportních vektorů léčiv, je očekáváno, že se významně rozšíří seznam léčiv, která mohou být podány bezpečně a efektivně na sliznici dutiny ústní. Pokud by toho bylo dosaženo, zlepšila by se nejen léčba mnoha nemocí ústní sliznice, ale také bylo umožněno systémové podání léčiv, která v současné době vyžadují parenterální aplikaci, pro pacienty více přijatelným způsobem.<sup>1</sup>

Léčivo se může vstřebat z dutiny ústní hned z několika oblastí. Existuje bukální podání léčiva, přes tvrdé patro a dásně, nejlépe využitelným způsobem je však zřejmě sublingvální cesta a to především díky vysokému prokrvení, tenkosti membrány a významnému povrchu membrány. Celková plocha membrány v ústní dutině činí asi 170 cm<sup>2</sup>, z čehož přibližně 50 cm<sup>2</sup> tvoří nekeratinizovaná tkáň. Každý druh mukózy má jiné vlastnosti, které pak ovlivňují vstřebání léčiv.<sup>2,3</sup>

Systémové podání léků přes sliznici dutiny ústní se vyznačuje mnohými zvláštnostmi. Léčivo musí být uvolněno z lékové formy na místo absorpce (např. ústní nebo sublingvální oblast) a přes slizniční vrstvy vstupuje do systémové cirkulace. K permeaci látek přes membránu dochází dvěma hlavními způsoby, jedná se o cestu transcelulární (látka prochází přímo buňkami) a paracelulární (látka prochází meziprostorem mezi buňkami). Obě tyto cesty se mohou kombinovat, avšak jedna zpravidla převládá. Další možností průchodu jsou specifické transportní mechanismy a endocytóza. Významnou roli v tomto procesu hrají některé fyziologické parametry ústní dutiny, např. pH, objem tekutin a činnost enzymů a propustnost sliznice dutiny ústní.<sup>2</sup>

## 3.2 Zásadní vliv slin na sublingvální aplikaci léčiv

Zásadní vliv na prostředí ústní dutiny má sekrece slin, které ovlivňují zejména pH, objem a složení tekutiny. Sliny jsou vylučovány třemi hlavními slinnými žlázami, příušními, podčelistními a podjazykovými, mnoho menších žlázek se nachází také ve sliznici nebo bezprostředně pod sliznicí. Příušní žlázy a podčelistní žlázy produkují vodnatý sekret bohatý na enzymy, zatímco sublingvální žlázy produkují hlavně viskózní sliny s omezenou enzymatickou aktivitu. Hlavní funkcí slin je zvlhčovat ústní dutinu, usnadňovat polykání, udržovat pH a bránit demineralizaci zubů. Umožňují také trávení sacharidů, regulují ústní mikrobiální flóru.<sup>4,5</sup>

Celková denní produkce slin se pohybuje mezi 0,5 a 2,0 litry. Avšak objem slin neustále přítomný v ústech je jen asi 1,1 ml, což představuje relativně nízký objem kapaliny pro uvolňování léčiv z nosičů ve srovnání s GIT. Ve srovnání s trávicími šťávami jsou sliny relativně málo viskózní, obsahují 1 % organických a anorganických složek. Sliny jsou slabým pufrům s pH 5,5 až 7,0. Složení slin a jejich pH jsou závislé na rychlosti jejich tvorby, která zase závisí na třech faktorech: denní době, druhu stimulu a stupni stimulace. Zvýšení rychlosti tvorby slin má za následek přiblížení pH slin k pH krve a zvýšení obsahu sodných a hydrogenuhličitanových iontů.<sup>6</sup>

Sliny tvoří příznivé prostředí pro uvolňování léčiv z aplikačních systémů, zejména systémů založených na hydrofilních polymerech. Tvorba slin ale také omezuje čas uvolnění léku na místě podání. Vysoká tvorba slin může vést k předčasnému polknutí léčiva dříve, než nastane efektivní absorpce přes sliznici dutiny ústní.<sup>7</sup>

## 3.3 Propustnost sliznice úst

Propustnost ústní sliznice představuje významnou fyziologickou bariéru pro orální vstřebání léků. Tloušťka ústní sliznice je proměnlivá v závislosti na místě a stavbě epitelu. Mechanicky namáhané oblasti sliznice (dásně a tvrdé patro) jsou keratinizovány podobně jako epidermis. Sublingvální, bukalní sliznice a sliznice

měkkého patra však keratinizovány nejsou. Keratinizovaný epitel obsahuje neutrální lipidy, hlavně ceramidy a acylceramidy, které plní bariérovou funkci. Tyto epitely jsou relativně nepropustné pro vodu. Nekeratinizovaný epitel neobsahuje acylceramidy a jen malé množství ceramidů.<sup>7</sup> Obsahuje ale polární lipidy, především sulfáty cholesterolu a glukosylceramidy. Takové složení způsobuje výrazně větší propustnost pro vodu než v případě keratinizovaného epitelu.<sup>8,9</sup>

Relativní nepropustnost sliznice dutiny ústní je způsobena především látkami obsaženými v membránu obalujících granulích (MCGs), jež jsou umístěny v mezibuněčném prostoru.<sup>10</sup> MCGs jsou kulaté nebo oválné orgány mající 100 nm až 300 nm v průměru a zjištěny jak keratinizovaném tak nekeratinizovaném epitelu.<sup>11</sup> MCGs uvolňují lipofilní materiál do mezibuněčného prostoru k zajištění soudržnosti epitelu. Tento lipofilní materiál zpomaluje průchod hydrofilních materiálů přes epitel.<sup>12</sup>

### 3.4 Vliv vrstvy hleny na permeaci částic

Buňky ústního epitelu jsou pokryty hlenem, který je složen z bílkovin a sacharidů. Jeho tloušťka se pohybuje od 40  $\mu\text{m}$  do 300  $\mu\text{m}$ .<sup>13</sup> Ačkoli většinu hleny tvoří voda (95 až 99 % hmotnostních) klíčovou makromolekulární složkou je skupina glykoproteinů známá jako muciny (1 až 5 %). Muciny jsou makromolekulární látky s molekulovou hmotností v rozmezí od  $5 \cdot 10^5$  do více než  $2 \cdot 10^7$ , které obsahují velké množství sacharidů. Muciny se skládají ze základních jednotek ( $4 \cdot 10^5$  až  $5 \cdot 10^5$ ) propojených v lineární řetězce. Tyto velké molekuly jsou schopné se spojovat a tvořit trojrozměrné sítě.<sup>14</sup> Přibližně 10 % až 30 % hmotnosti molekuly tvoří peptidové jádro, které je spojeno přes O-glykosidické vazby s oligosacharidickými řetězci, které tvoří zbývající 70 % až 80 % celkové hmotnosti.<sup>15</sup> Cukerné zbytky jsou přímo spojeny s bílkovinou páteří mucinu. Pět nejčastěji nalezených monosacharidů v mucinu jsou N-acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin, galaktosa, fukosa a sialová kyselina.<sup>16</sup> Páteřní řetězce polysacharidových řetězců se skládají z řad Gal  $\beta(1-3)$  a N-acetylGlc  $\beta(1-4)$  jednotek a jsou obvykle ukončeny  $\alpha$ -glykosidicky vázanou galaktosou,

N-acetylgalaktosou, fukosou, sialovou kyselinou, nebo sulfátem. Sialová kyselina a sulfátové zbytky přispívají k celkovému zápornému náboji na oligosacharidové části výsledné makromolekuly.<sup>17</sup>

Vrstva hleny je považována za významnou bariéru vstřebávání léčiv prostřednictvím dýchacího, trávicího a reprodukčního traktu. Byly provedeny četné studie o vlastnostech hleny s cílem identifikovat hlavní složky, stejně jako faktory, které rozpuštěné látky ovlivňují pohyb v této bariéře.<sup>18</sup>

Vlastnosti hleny velmi ovlivňují výsledné chování permeujících částic. Hlen pokrývající různé sliznice může mít značně odlišné vlastnosti. Nízkomolekulární látky prostupující hlenem jsou zpravidla více či méně bržděny v závislosti na interakci dané látky s hlenem. S rostoucí velikostí molekuly narůstá i odpor, který klade vrstva hleny prostupující částici.<sup>17</sup>

Dalším důležitým faktorem, který může hrát roli při omezení transportu léčiva přes hlen, je přímá vazba rozpuštěné látky k hleny. Různé studie ukazují, že kladně nabitě nízkomolekulární látky, jako je amikacin,<sup>19</sup> gentamycin, tobramycin<sup>20</sup> a některá  $\beta$ -laktamová antibiotika<sup>20,21</sup> se elektrostaticky váží k záporně nabitým složkám hleny.

### 3.5 Nanočástice PD Chromeon 470

Pro permeační pokus byly použity fluorescenčně značené nanočástice z materiálu PD, s firemním označením Chromeon 470, jež dodává firma Sigma-Aldrich. Dostupné informace o těchto částicích jsou poměrně skromné.

PD je nový polymer, který nabízí podobné vlastnosti jako polystyren, ale má mnohem nižší propustnost pro kyslík, což má za následek vyšší fotostabilitu pro většinu barviv. Velikost je asi 40 nm. Částice jsou ve formě 0,5% (w/w) vodní suspenze v pufru (10 mM, pH 7). Excitační vlnová délka ve vodném prostředí je 470 nm a emisní vlnová délka je 603,0 $\pm$ 5,0 nm. Dle certifikátu šarže je maximum emise při vlnové délce 600 nm. Částice je třeba uchovávat v teplotě od 2 do 8°C.<sup>22</sup>

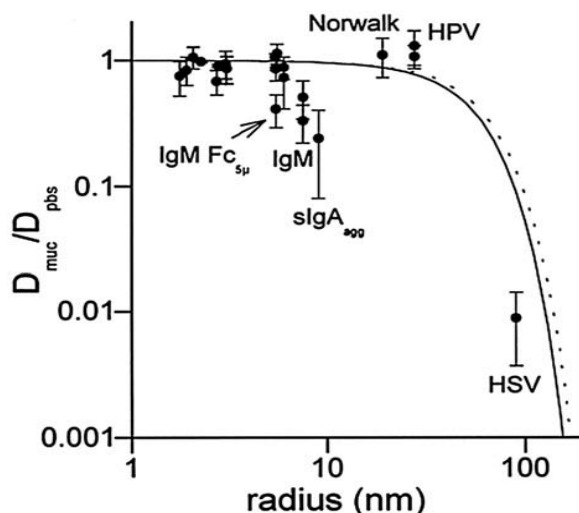
Průnik nanočástic přes různé fyziologické bariéry je poměrně intenzivně zkoumán, protože podání léčivých látek touto cestou dává řadu revolučních možností. Výsledky jsou ale poměrně rozporuplné, protože experimentální výsledek závisí na mnoha faktorech. Z dostupných zdrojů jsem se pokusil shromáždit poznatky, k nimž dospěla různá výzkumná pracoviště. Autoři si všímají nejen prostupu vlastní tkáně, ale i vrstvou hlenu, jež pokrývá každou sliznici.

### **3.6 Vlákna hlenu jako překážka pohybu částic**

Během pokusu s polystyrenovými nanočásticemi o průměru 106 nm nebylo upozorováno, že by jakékoliv nanočástice prostoupila celou vrstvou nativního vepřového hlenu během doby 1 týdne. To bylo ve studii vysvětleno tím, že velikost pórů v hlenu činí podle autorů přibližně 14 nm, což je mnohem menší velikost než velikost nanočástic použité ve studii.<sup>23</sup>

Jiní autoři ve své studii průchodu polystyrenových nano a mikrosfér přes 30 µm až 50 µm tlustou mukózní vrstvu z distální části tlustého střeva krysy zjistili, že nejmenší nanosféry o velikosti 14 nm prochází mukózní vrstvou a dosahují apikálního povrchu během 2 minut, větším nanosférám o velikosti 425 nm to trvá 30 minut a částice o velikosti 1090 nm apikálního povrchu nedosáhly, ale zachytily se v hlenu. Tato studie ukazuje na větší velikost pórů v hlenu než velikost 14 nm, kterou předpověděli autoři předchozí zmíněné studie.<sup>24</sup>

Polystyrenové nanočástice o velikosti 59 nm, kovalentně modifikované karboxylovými skupinami na povrchu, v lidském hlenu děložního hrdla jsou zcela imobilizovány.<sup>25</sup>



**Obr. 1:** Normalizované difúzní koeficienty pro proteiny a viry v hleny.<sup>25</sup>

Pokud se částice šíří v hleny (muc) stejně rychle, jako se šíří ve fyziologickém roztoku (pbs) potom  $D_{\text{muc}}/D_{\text{pbs}} = 1$ . Linie v grafu jsou poměrem předpokládaným podle Amdenova obstrukčního modelu. V modelu je uvažován poloměr mucinových vláken 3,5 nm a hustota sítě rozmístěných vláken 100 nm (plná čára) nebo 110 nm (tečkovaná čára).<sup>25</sup>

Vliv velikosti částic, povrchového náboje a hydrofobnosti povrchu na propustnost polystyrenem modifikovaných nanočástic v prostředí syntetického žaludečního hleny studovali rovněž Norris a Sinko. Ti došli k závěru, že  $\zeta$ -potenciál negativně nabitých nanočástic významně neovlivňuje jejich propustnost hlenem. Propustnost se ale prudce snížila se zvětšením velikosti částic z 0,1  $\mu\text{m}$  na 0,3  $\mu\text{m}$ . Studie také ukázala, že nanočástice s více hydrofobním povrchem měly nižší prostupnost syntetickým hlenem. Jak již bylo dříve pozorováno u molekul léčiv, rychlost pronikání částic přes slizniční vrstvy je vysoce závislá na experimentální technice a typu vyšetřovaného hleny.<sup>26</sup>

Ačkoli jsou velké nanočástice farmakokineticky výhodnější kvůli lepším možnostem transportu léčiva a výhodnější kinetice uvolnění léčiva, optimální velikost pro slizniční aplikace je pravděpodobně dosti omezena. Nanočástice, které jsou příliš velké, i když mají vyhovující povrch z hlediska mukoadheze, nemohou hlenem prostupovat rychlostí dostatečnou pro překonání mukociliární clearance z důvodu zvýšených třecích sil vyplývajících z Stokes-Einsteinovy rovnice. Vzhledem k tomu, že

tloušťka hlenové vrstvy a čas mukociliární clearance se liší u různých slizničních tkání, mohou být také různé potřebné difuzní rychlosti, aby částice byly schopné překonat hlen.<sup>27</sup>

Ve snaze proniknout do hleny se syntetické nanočástice musí vyhnout přilnavosti k vláknům hleny a být dostatečně malé, aby se zabránilo významné jejich sterické inhibici při pohybu hustou sítí. Bylo prokázáno, že nanočástice velká 500 nm, je-li dostatečně pokryta mukoinertním polymerem (PEG), může procházet fyziologickým lidským hlenem pouze 4násobně sníženou rychlostí ve srovnání s jejich rychlostí v čisté vodě.<sup>28</sup>

V zásadě existují dva typy částicových nosičů léků: hydrofobní a hydrofilní. Hydrofobní nosiče mají výhodu pomalého vytrvalejšího uvolňování, ale zase mohou být nestabilní v biologických tekutinách, vykazují špatnou interakci s biologickými povrchy a jsou schopné jen obtížně přenášet hydrofilní makromolekuly. Naopak hydrofilní nosiče léků dobře přilnou na biologické povrchy, vykazují silnou afinitu k hydrofilním makromolekulám, ale mají rychlý uvolňovací profil. To vedlo k rozvoji hydrofilních potahů na hydrofobní nanočástice pro zlepšení jejich transportu přes slizniční povrchy při zachování pomalého uvolňovacího profilu. Mezi ně patří polyethylenglykolové a chitosanové potahy.<sup>29</sup>

### 3.7 Endocytóza

Receptory zprostředkovaná endocytóza je pojem užívaný k popisu skupiny endocytárních mechanismů, kde je impulsem stimulujícím endocytózu přenášený materiál, a to prostřednictvím interakce s receptorem na buněčné membráně. Receptorem zprostředkovaná endocytóza zahrnuje jak mechanismy závislé na klathrinu, tak i mechanismy na klathrinu nezávislé. Klathrin má formu těžkého a lehkého řetězce. Spojením těchto řetězců vzniká klathrinový váček.<sup>30</sup> Tyto váčky mohou mít různý tvar a velikost, ale obecně se předpokládá velikost do 150 nm v průměru.<sup>31</sup>

Naproti tomu fagocytóza je na klathrinu nezávislý, receptorem zprostředkovaný příjem exogenního materiálu specializovanými fagocytárními buňkami, např. makrofágy. Vchlípnována je poměrně velká (až 1  $\mu\text{m}$ ) oblast membrány.<sup>32</sup>

Velikost částic silně ovlivňuje zahájení určitých mechanismů endocytózy. Tento poznatek přinesly experimenty, během nichž byly kultivovány fluorescenčně značené polystyrenové nanočástice s průměrem 50, 100, 200, 500 a 1000 nm s myšními buňkami (melanom B16-F10). Buňky byly ovlivněny selektivními inhibitory endocytózy, aby se ukázaly cesty používané při pohlcování nanočástic. Konfokální mikroskopie ukázala, že na vchlípnování nanočástic o průměru do 200 nm se podílely klathrinové váčky. Kaveolami zprostředkovaná endocytóza se stala více zřejmá u částic o velikosti na 200 nm až 1000 nm. Částice o velikosti 50 nm až 100 nm byly pohlcovány buňkami rychleji než nanočástice o velikosti 200 nm, mechanismus tohoto jevu je však nejasný.<sup>33</sup>

Na významný vliv zpracování vzorků poukazuje řada autorů, zacházení se vzorkem může mít zásadní dopad na informační hodnotu experimentu, na to, jestli výsledek získaný in vitro bude vypovídat také o jevu probíhajícím in vivo. Pro zachování autentických vlastností tkání se doporučuje neskladovat vzorky sliznice dutiny ústní. I když je zmrazení běžnou a velmi užitečnou technikou pro uložení izolovaných živých buněk, je to nevhodná metoda pro ukládání kusů tkáně. Tvorba ledových krystalů v buňkách a mezi buňkami poškozuje tkáň. U izolovaných buněk a velmi tenkých řezů, lze tento problém částečně překonat velmi rychlým zmrazením kapalným propanem.<sup>34</sup>



# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Suroviny

Chromeon 470	Sigma-Aldrich
Dihydrogenfosforečnan sodný (ČL 2009)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Hydrogenfosforečnan sodný (ČL 2009)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Azid sodný (p.a.)	Chemapol, Praha
Čištěná voda (ČL 2009)	FaF UK, Hradec Králové
Chlorid sodný (ČL 2009)	Penta, Praha
Ethanol 96% (ČL 2009)	Penta, Praha
Methanol (ČL 2009)	Penta, Praha

Všechny suroviny byly podle deklarací výrobců a dodavatelů kvality lékopisné nebo vyšší. Čištěná voda pochází z centrální přípravy na FaF UK v Hradci Králové a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

## 4.2 Přístroje

Analytické váhy Kern 440-45N	Kern Sohn GmbH, Německo
Digitální pH metr Gryf 209 L	Gryf HB s.r.o., Česká republika
Elektronická míchačka	Variomag Labortechnik, Německo
Vodní lázeň Grant JB5	Grant Instruments, Velká Británie

Termostat BT50	Labor. přístroje, Česká republika
Magnetické míchadlo Telesystem	H-P Labortechnik, Německo
Spektrofluorometr Aminco Bowman Series 2	Thermo Fisher, USA
Křemenná kyveta 1 cm	
Software: AB2 verze 5.50 (2003)	

## 4.3 Přípravné práce

### 4.3.1 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr o pH = 7,4 bez přídavku azidu sodného jsem použil jako akceptorovou fázi a k vymytí a eluci očištěných sublingválních membrán jsem použil fosfátový pufr s přídavkem azidu sodného.

#### Složení:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,1 g/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	19,1 g/l
NaCl	4,4 g/l
$\text{NaN}_3$	0,02 g/l

**Postup:** Rozpustil jsem dihydrogenfosforečnan sodný v 500,0 ml vody a hydrogenfosforečnan sodný v 400,0 ml vody. V případě přípravy pufru pro vymytí membrán jsem ještě navíc rozpustil azid sodný v 500,0 ml dihydrogenfosforečnanového roztoku. K přibližně 200,0 ml roztoku hydrogenfosforečnanu jsem přidal 500,0 ml

roztoku dihydrogenfosforečnanu a změřil jsem pH. Za stálého míchání na magnetické míchačce jsem doladil pH postupným přidáváním roztoku hydrogenfosforečnanu na požadovanou hodnotu. Po dosažení požadovaného pH jsem zjistil přesný objem roztoku. Vzhledem k tomuto objemu jsem dopočítal a dovážil potřebné množství chloridu sodného určeného k izotonizaci.

#### **4.3.2 Příprava sublingvální membrány**

Jazyky z prasete domácího byly získány z místních jatek. Předem bylo zajištěno kvalifikované zacházení s nimi tak, aby jazyky splňovaly parametry pro využití v permeačním experimentu. Pomocí skalpelu byla odřezána sublingvální oblast jazyka, která byla dále očištěna od svaloviny jazyka, aby množství zbývajících svaloviny neovlivňovalo permeační pokus. Zároveň bylo velmi dbáno na to, aby nedošlo k proříznutí nebo jinému poškození sublingvální membrány. Membrány byly dočasně uchovávány v pufru o pH = 7,4 s přídavkem azidu sodného. Membrány byly po separaci osušeny, pečlivě zataveny do folie a přeneseny do mrazničky, kde zůstaly při cca -18 °C pro pozdější využití.

#### **4.3.3 Permeační komůrka**

Pro hodnocení permeability sublingvální membrány byla použita katedrální modifikace Franzovy permeační cely pro horizontálně umístěné membrány, rozdělující komůrku na donorovou část a akceptorovou část. Do akceptorové části jsem vložil míchadlo a naplnil ji fosfátovým pufrem.

Do donorové části byl nanášen 0,5% roztok částic Chromeon 470 bez další úpravy. Mezi dvě základní části se vkládají plexiskla s vyřezaným otvorem, mezi nimiž je upevněna sublingvální membrána, která je po bocích utěsněna silikonovým tukem. Permeační cely mají každá jiný objem akceptorové části, což je způsobeno jednak fyzicky rozdílným objem skleněné nádoby, ale i prohnutím sublingvální membrány

při naplnění cely oběma fázemi. Tento jev je třeba zohlednit při dalších výpočtech. Akceptorová část umožňuje průběžné odebírání vzorků a zpětné doplňování pufru. Každá permeační cela je umístěna do vodní lázně o teplotě asi 37 °C na desku s magnetickými míchadly, která zajišťuje neustálé promíchávání akceptorové fáze pomocí míchadla v akceptorové části komůrek. Teplota ve vodní lázni byla udržována termostatem a sledována teploměrem.

## **4.4 Provedení úvodních permeačních experimentů**

### **4.4.1 Pilotní permeační pokusy**

Cílem první série permeačních pokusů (2. 5. 2011), bylo utvrdit se o správném technickém provedení pokusu a stanovit fluorescenčně značené částice případně přecházejících přes sublingvální membránu do akceptorové fáze. S tímto typem permeačního experimentu nebyly zatím na katedře zkušenosti, a proto nebyla možnost vycházet z dřívějších poznatků.

### **4.4.2 Permeační pokus č. 1 (2. 5. 2011)**

Pokusu se účastnily 3 cely. Lázeň byla temperována na teplotu 37,5°C. Akceptorová fáze byla tvořena izotonickým fosfátovým pufrem pH 7,4. Odebírané množství 0,7 ml bylo doplňováno opět fosfátovým pufrem pH 7,4 bez přídavku azidu sodného. Objem permeačních cel byl 20 ml zmenšený o množství, které zbylo v injekční stříkačce použité pro naplňování. Tento zbylý objem byl přelit do odměrných zkumavek a změřen, aby bylo možné zjistit přesný objem akceptorové fáze v celách. Zbytkový objem měl konkrétně hodnoty 1,3 ml, 0,9 ml a 0,7 ml.

Permeační komůrky v první sadě pokusů byly vybaveny otvorem o ploše 2 cm<sup>2</sup>, použit byl zmražený jazyk z 19. 1. 2011 (tedy 3,5 měsíce starý). Na donorovou stranu

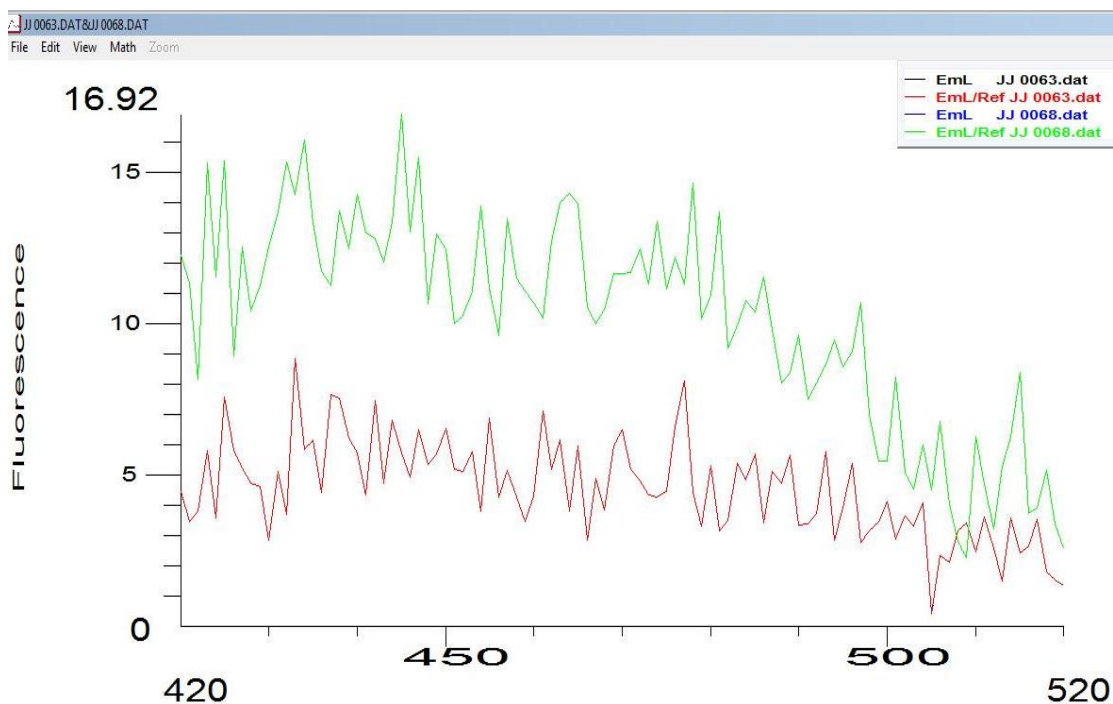
bylo naneseno 200 mikrolitrů 0,5% suspenze částic Chromeon 470. Toto množství mělo zajistit dostatečnou koncentraci částic na donorové části cely i dostatečný rezervoár, protože se vysoká permeabilita částic nepředpokládala. Na začátku experimentu byl změřen odpor mezi donorovou a akceptorovou fází. Změřený odpor nabýval hodnot 663 MΩ, 1270 MΩ a 450 MΩ, což svědčilo o vstupní neporušenosti sublingválních membrán. Odběry probíhaly po 6, 16, 22, 28 a 40 hodinách.

Během pokusu došlo k vyschnutí donorové fáze, což bylo zapříčiněno vysrážením rozpouštědla na stěny donorové části permeačních komůrek. Byla snaha toto korigovat přidáním 3 kapek pufru pH 7,4. Během tohoto odběru byla i odhalena a odstraněna bublina ve vzorku č. 2, která měla velikost přibližně 1/3 z permeační plochy. Po odběru po 28 hodinách a po konzultaci bylo přidáno při čtvrtém odběru na donorovou stranu dalších 0,3 ml pufru. Po posledním odběru po 40 hodinách trvání pokusu byl opět změřen odpor, který nabýval hodnot 270 MΩ, 230 MΩ a 220 MΩ, což dává informaci o zachované celistvosti podjazykových membrán. Odebrané vzorky byly uchovávány v chladicím boxu při 6 °C.

#### 4.4.3 Řešení problémů spojených s měřením kalibrační křivky

Velmi zhruba jsem určil hodnoty emitance pro dané řády ředění koncentrací analytu. Sadu standardů jsem získal opakovaným ředěním 1:10 v rozmezí 1:10<sup>2</sup> až 1:10<sup>6</sup>. Po získání prvních odebraných vzorků jsem upřel pozornost k ředěním mezi 10 000násobným a 100 000násobným. V tomto rozpětí jsem vytvořil první verzi kalibrační křivky, která ukázala, s jakými problémy se bude třeba vypořádat.

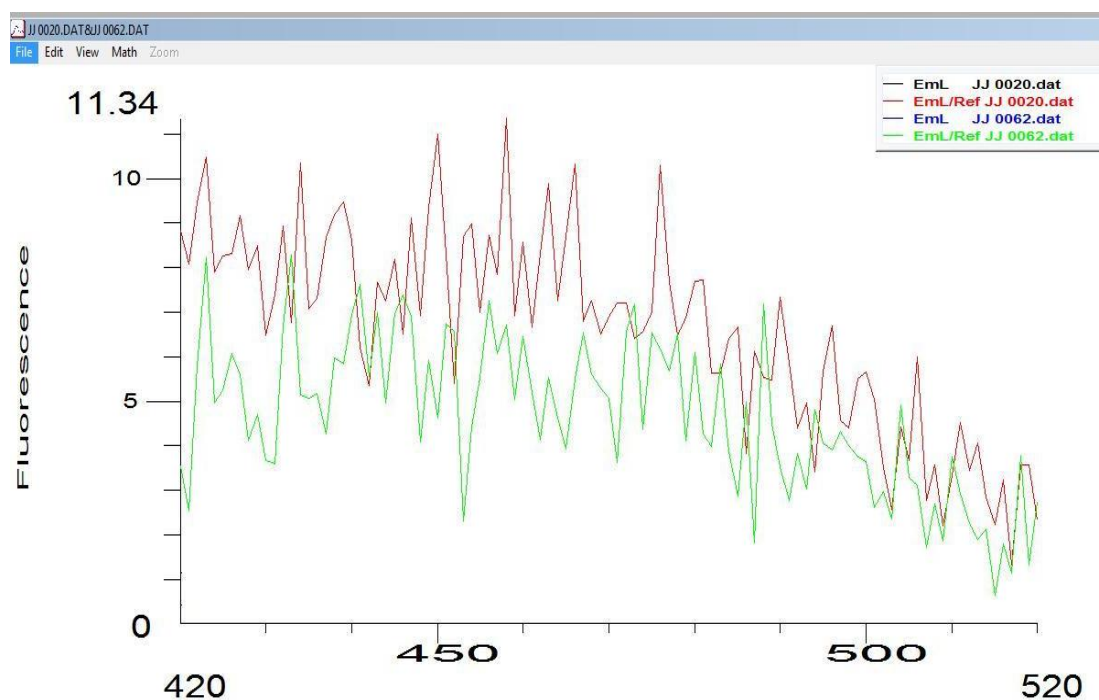
Přejaté nastavení fluorescenčního spektrofotometru se ukázalo pro účely měření nižších koncentrací analytu nedostatečně citlivé. Pro detekci bylo potřeba nastavení přístroje na nejvyšší citlivost, kde se projevuje i velká míra šumu. Ze záznamu na **Obr. 2 a 3** bylo možné tušit, že standardy a vzorky dávají jinou odezvu než slepý vzorek, ale určení koncentrací by bylo velmi obtížné a nepřesné.



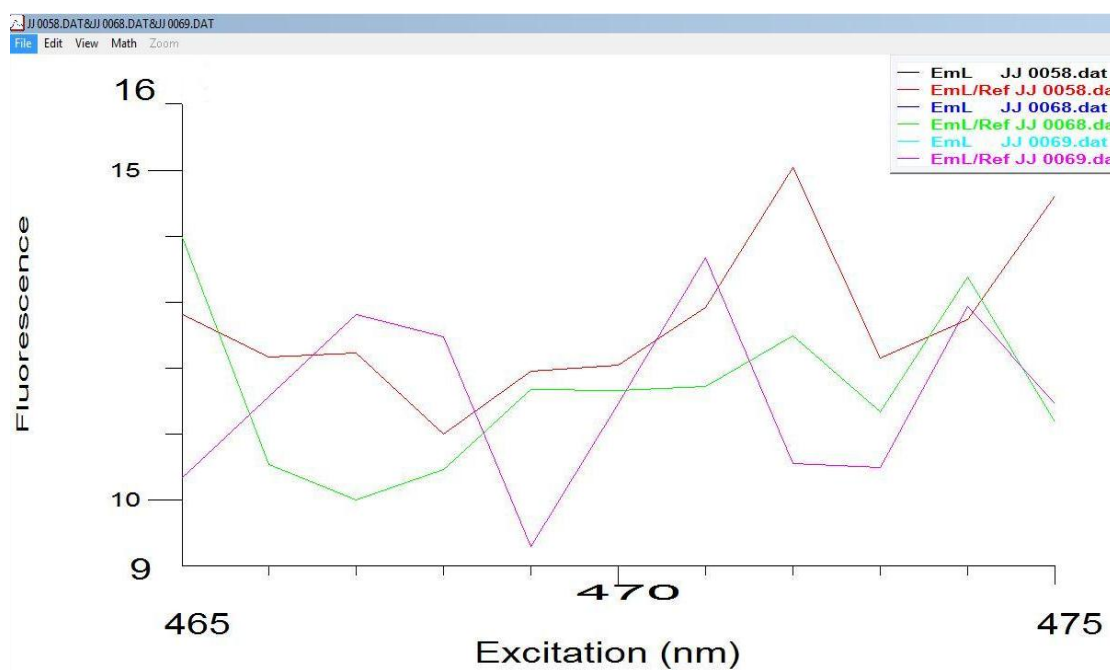
**Obr. 2:** Slepý vzorek (červená linie) proti 0,5 ppm (ředění 1:10000) v původním nastavení (zelená linie)

Na **Obr. 2** je možné vytušit, že linie standardu se nachází vysoko nad linií slepého vzorku. Vyjádření ppm (parts per million, díl na milion dílů) bude používáno při popisu koncentrace i nadále. Měření ukázalo, že analyt je i v těchto koncentracích jasně detekovatelný. K získání informace o kvantitě je ovšem třeba pořídit kvalitnější záznam.

Zvláště zřetelná se ukázala být tato potřeba po změření prvních vzorků, které ukázaly, že zvýšení hodnot emitance ve vzorcích je v oblasti 1 až 2 jednotek, kdy dochází k průnikům zaznamenaných hodnot vzorku a slepého vzorku, jak je vidět na **Obr. 3**.



**Obr. 3:** Emitance slepého vzorku (zelená barva) v porovnání se vzorkem po 6 hodinách permeačního pokusu (červená barva)



**Obr. 4:** Vymezená excitační oblast 465 až 475 nm v širokém pásu v měření při původním nastavení, záznam 3 měření po sobě, nejvyšší standard 0,5 ppm

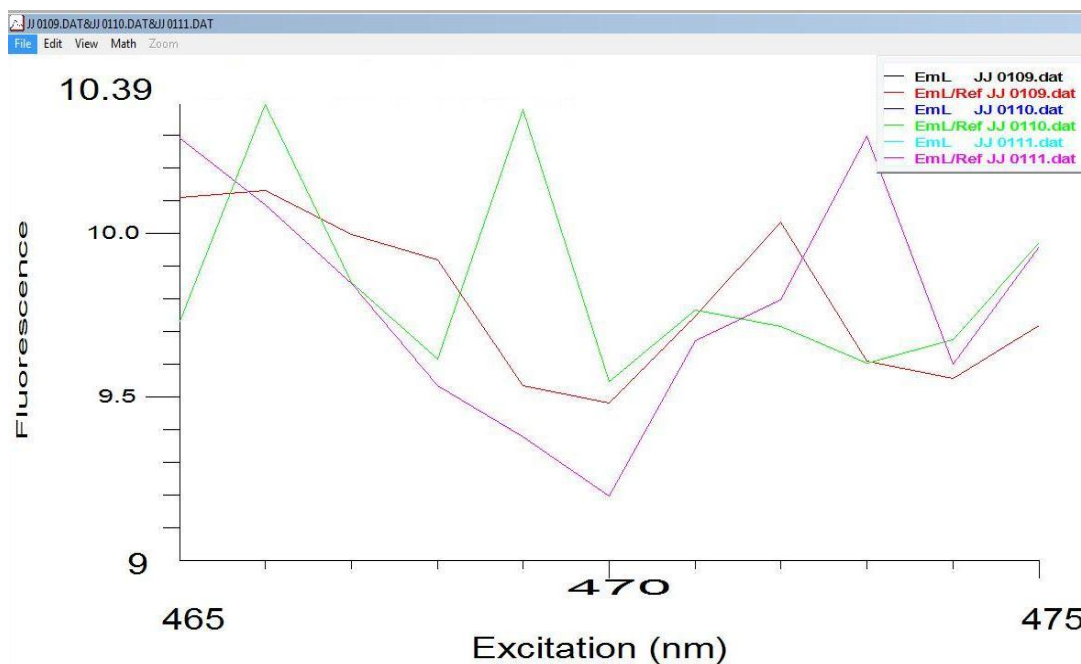
Z **Obr. 3** je možné vyčíst, že linie z měření vzorku odebraného po 6 hodinách permeace je umístěna poměrně jasně nad linií slepého vzorku, avšak míra šumu znemožňuje odečtení použitelné hodnoty pro stanovení obsahu.

Na **Obr. 4** je možné v detailu vidět kmity v rámci 4 jednotek emitance, které naprosto znevažují naměřené hodnoty vzorků. Zde na obrázku je měřen třikrát hned po sobě ten samý standard. Zobrazení je omezeno na oblast 5 nm v okolí excitačního maxima. Je třeba brát v potaz i škálu osy y, která má jiné měřítko, než je v následujících obrázcích.

#### 4.4.4 Úprava nastavení měřicího přístroje

K dosažení čistšího záznamu byly použity 3 úpravy nastavení. Postup používající průměrování záznamu pomocí klouzavého průměru hodnot okolních vlnových délek sice umožňoval určité vyhlazení záznamu a odečtení použitelných hodnot, ale byl by špatně obhajitelný. Šum ze svojí podstaty je jevem náhodným, a proto bylo rozhodnuto jeho vliv na měření snížit vícenásobným měřením, kdy výsledný záznam je průměrem ze všech měření emitance v oblasti excitace nanočástic. Finálně zvolený počet opakování měření vychází ze získaných experimentálních zkušeností. Zvyšování počtu repetice ovšem vedlo k ohromnému vzestupu času potřebného pro měření, a proto byla omezena skenovací oblast ořezáním oblastí, které nejsou zásadní pro kvantitativní stanovení, na okolí 5 nm od excitačního maxima analytu. Poslední postup, který vedl k snížení rozptylu záznamu, bylo snížení skenovací rychlosti. Dopad jednotlivých změn v nastavení je názorně ilustrován na následujících obrázcích.

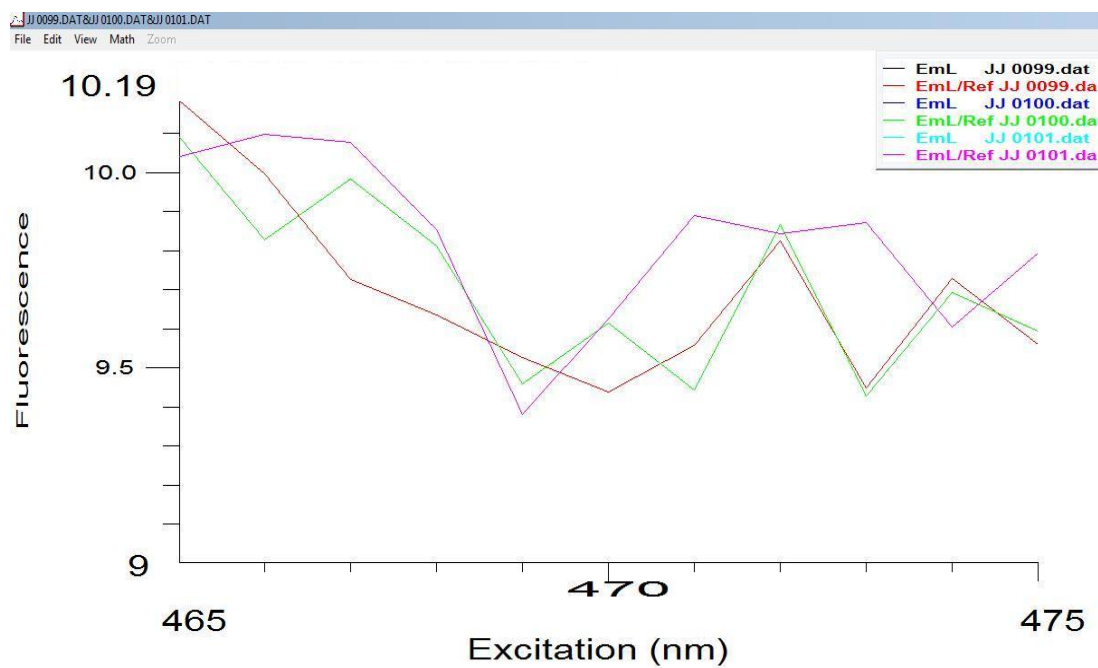




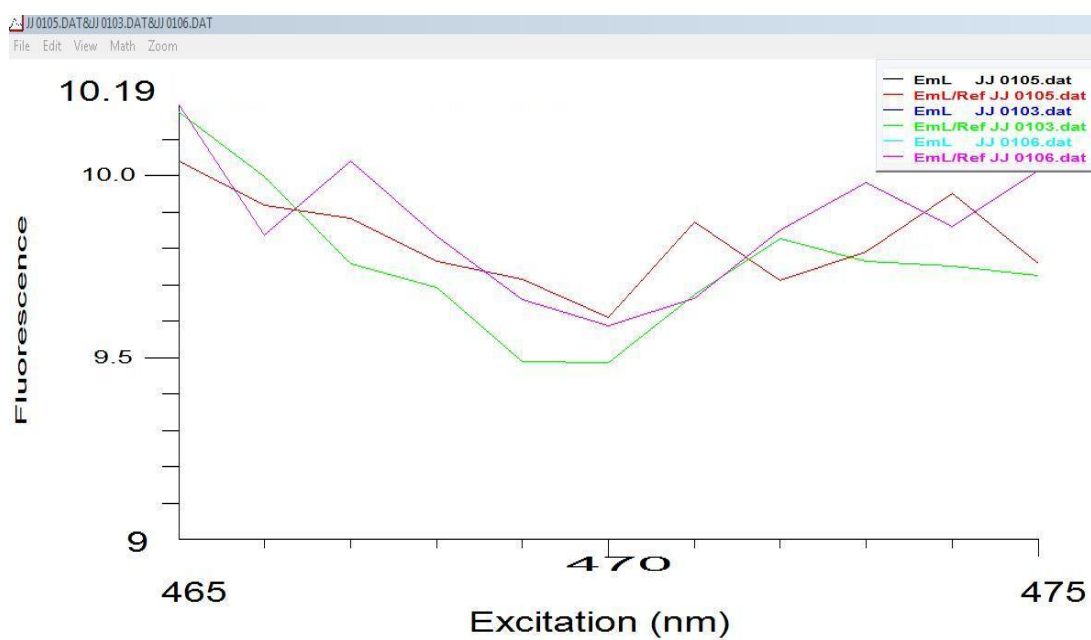
**Obr. 5:** Záznam z 3 po sobě jdoucích měření standardu 0,45 ppm při zachované původní skenovací rychlosti 40 nm/s, 25 opakování

Jak vyplývá z **Obr. 5**, opakovaným měřením vzorku došlo k značnému snížení rozptylu záznamu. Původní pohyb hodnot v pásu širokém 6 jednotek byl násobně omezen na přibližně 1 jednotku. Už první výsledky potvrdily správnost úvahy a povzbudily v dalším zkoušení různých nastavení přístroje.

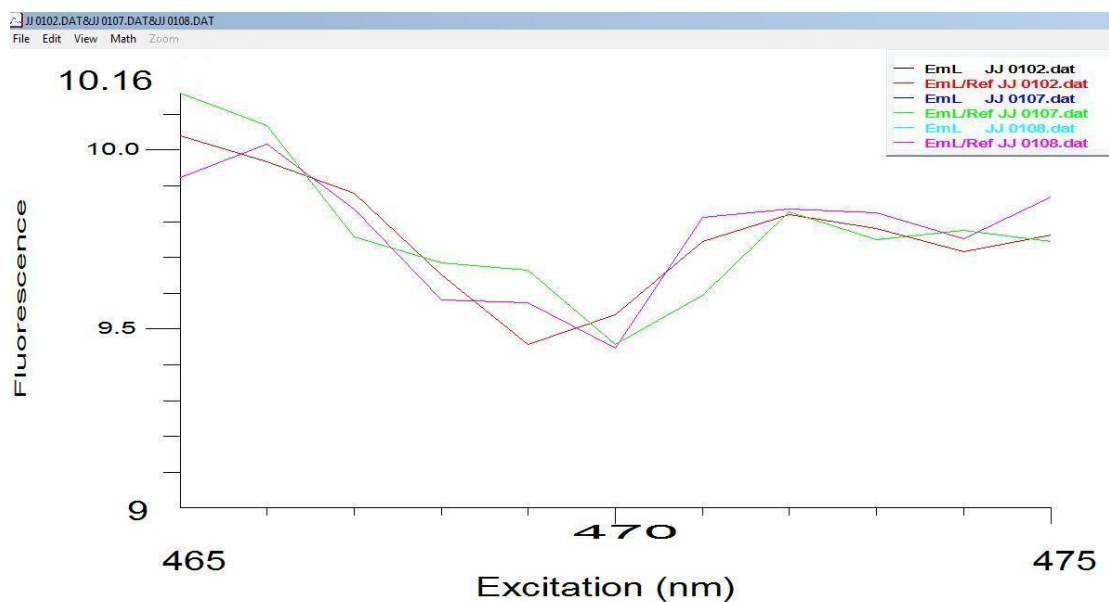
Možnost zvětšování množství repetice na měřicím přístroji je prakticky neomezená, a proto byla snaha o zjištění, nakolik je zvyšování repetice smysluplné. Pro následná měření byl už uplatněn i vliv snížení skenovací rychlosti, kdy je skenovací rychlost omezena na 10 nm/s.



**Obr. 6:** Záznam z 3 po sobě jdoucích měření standardu 0,45 ppm při skenovací rychlosti 10 nm/s, 10 opakování



**Obr. 7:** Záznam z 3 po sobě jdoucích měření standardu 0,45 ppm při skenovací rychlosti 10 nm/s, 25 opakování

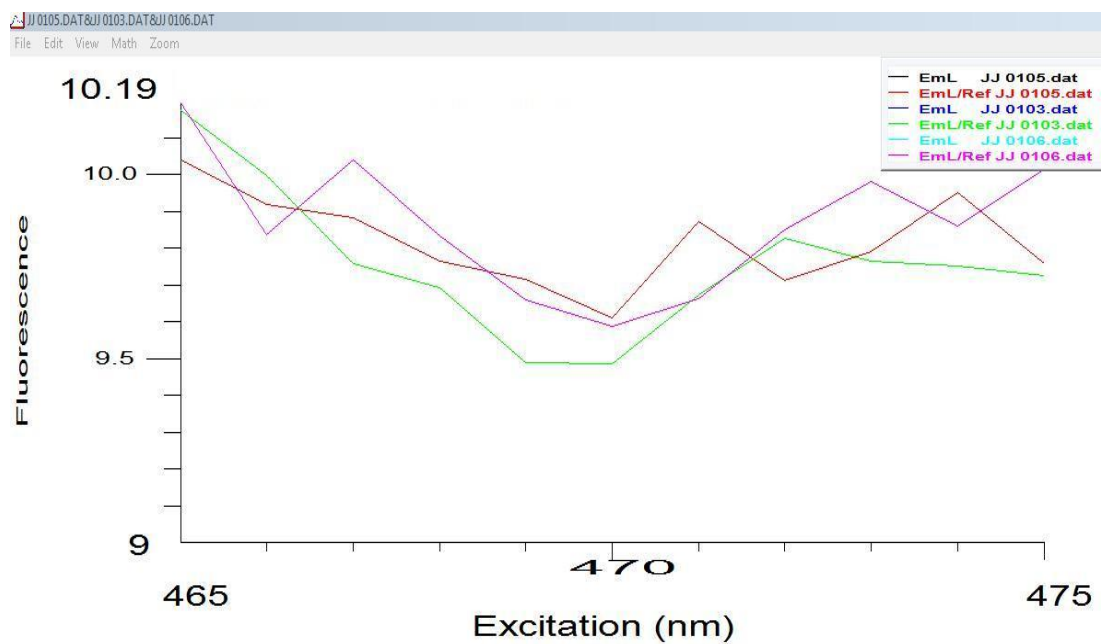


**Obr. 8:** Záznam z 3 po sobě jdoucích měření standardu 45 při skenovací rychlosti 10 nm/s, 50 opakování

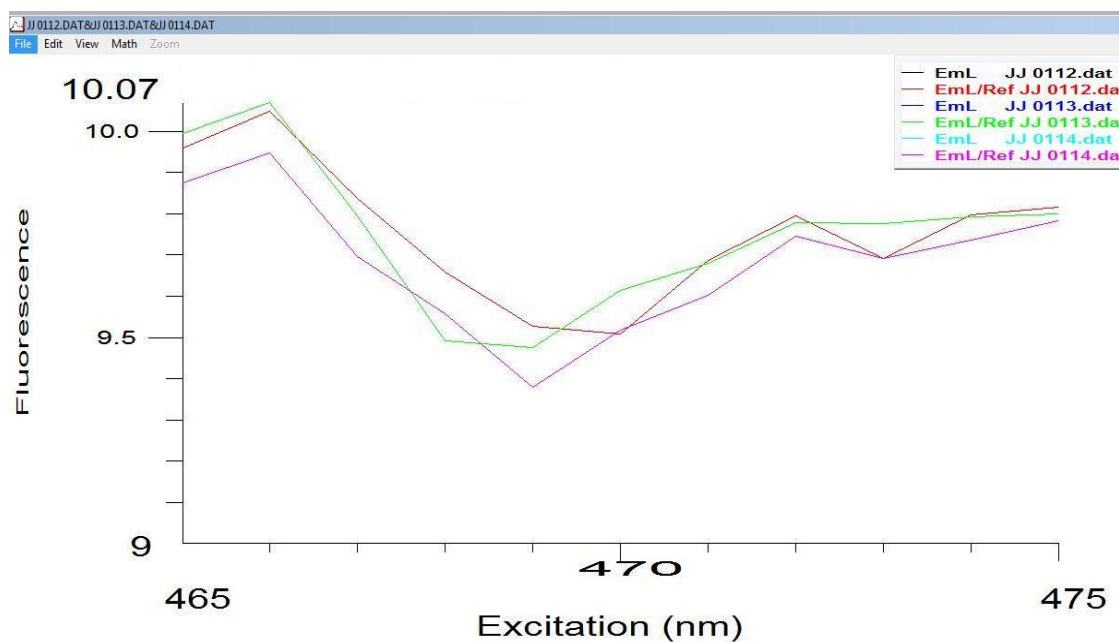
Z **Obr. 6 až 8** vyplývá, že je významný rozdíl mezi měřením sestávajícího se z 10 opakování a 25 opakování, avšak s dalším nárůstem na 50 opakování nedochází k významnému zkvalitnění záznamu.

Další možný postup jak získat stabilnější data bylo snížení skenovací rychlosti. Předpokladem bylo, že delší čas každého měření umožní přístroji lépe odečíst signál po každé změně vlnové délky, jež je provázena i mechanickými změnami polohy monochromátorů.

Právě tato technická okolnost fungování daného spektrofluorometru se ukázala být pro přesnost měření zásadní. Původní skenovací rychlost 40 nm/s odpovídá 25 ms na jeden krok. Během tohoto času musí dojít i k změně pozice monochromátoru. Výsledný čas na měření je potom ještě menší, popř. případně přístroj měří i během změny pozice, což má negativní vliv na kvalitu záznamu.



**Obr. 9:** Záznam z 3 po sobě jdoucích měření standardu 0,45 ppm po snížení skenovací rychlosti na 10 nm/s, 25 opakování



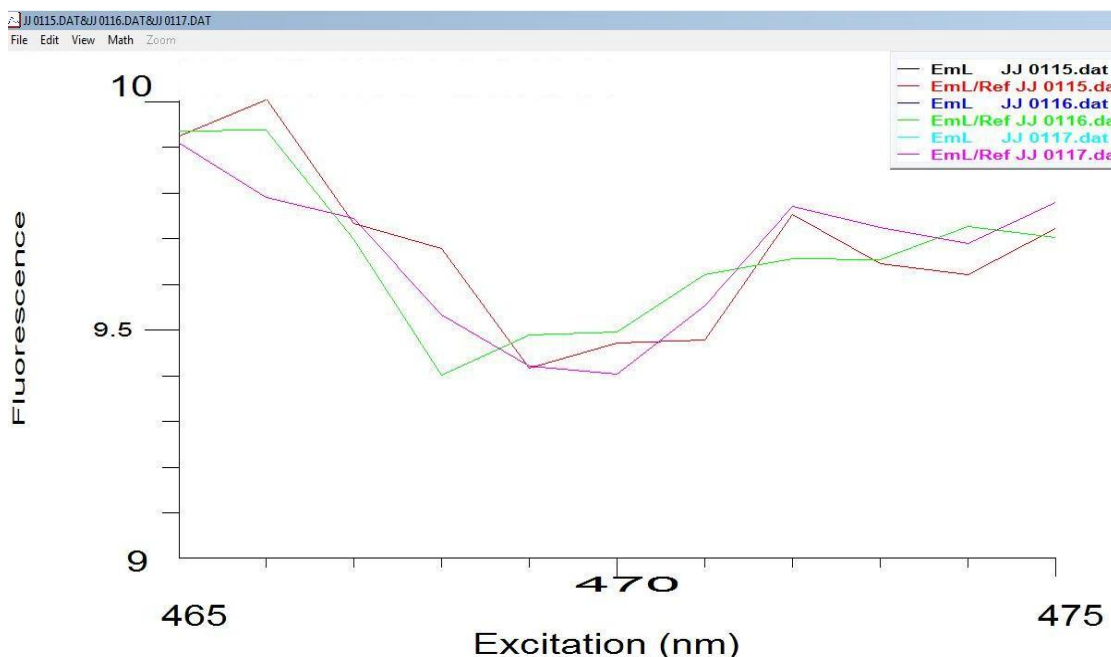
**Obr. 10:** Záznam z 3 po sobě jdoucích měření standardu 0,45 ppm při snížení skenovací rychlosti na 5 nm/s, 25 opakování

Do srovnání je vhodné zařadit i **Obr. 5** na straně 22, kde je záznam se skenovací rychlostí 40 nm/s. Srovnání **Obr. 5, 9, 10** je možno dojít k závěru, že snižování skenovací

rychlosti vede k značnému zlepšení detekce, záznamové křivky se sobě přibližují a mizí tendence k ustřelování hodnot.

Další snižování rychlosti detekce je ale spojeno s prudkým nárůstem času potřebného na měření. Proto bylo měření spojené s dalším snížením skenovací rychlosti spojeno se snížením množství měřících repetit.

Snahou autora bylo, aby měření trvalo do 2 min. Při nutnosti manuální výměny vzorků byla snaha omezit časovou náročnost sériového stanovení velkého počtu vzorků na přijatelnou úroveň. Samotné jedno měření trvá určitý čas, další čas trvá výměna vzorků. Výměna je spojena s vyjmutím vzorku z přístroje, navrácení vzorku do zkušavky, dvojnásobným vymytím kyvety čištěnou vodou a třetím výplachem pomocí ethanolu denaturovaného methanolem. Následné sušení kyvety v blízkosti měřicího přístroje netrvá dlouho, neboť měřicí přístroj generuje značné množství tepla. Do kyvety je umístěn vzorek, kyveta je přeleštěna speciálními k tomuto účelu určenými papírky a umístěna do měřicího přístroje.



**Obr. 11:** Záznam z 3 po sobě jdoucích měření standardu 0,45 ppm při snížení skenovací rychlosti na 2 nm/s, 10 opakování

Srovnáním záznamů na **Obr. 11** a na **Obr. 6** můžeme dojít k závěru, že i snížení skenovací rychlosti z 10 nm/s na 2 nm/s má velmi významný vliv na kvalitu záznamu. I při nízkém počtu opakování je možné dosáhnout velmi stabilního záznamu. V zájmu rozumného, prakticky použitelného času detekce bylo třeba nalézt kompromis mezi snahou zvýšit množství repetice a snížit skenovací rychlost.

Po důkladném posouzení všech testovaných variant bylo vybráno následující nastavení: **měřicí cyklus sestávající se z 25 skenovacích repetice při skenovací rychlosti 5 nm/s**, (při krokování 1 nm připadá na analýzu každého vlnové délky 0,2 s). Všechny další nastavitelné parametry měřicího přístroje jsou shrnuty v následujícím výčtu.

Typ měření: excitační sken

Oblast excitačního skenu: 465 až 470 nm

Vlnová délka emise: 600 nm

Velikost kroku: 1 nm

Monochromátor excitace: 470 nm, šířka pásu 4 nm, clona otevřená

Monochromátor emise: 600 nm, šířka pásu 4 nm, clona otevřená

Napětí fotonásobiče (senzitivita): 1275 V (maximální nastavitelná)

Mód měření: průměrování

Typ lampy: 150 Watt Xenon

#### **4.4.5 Vlastní měření kalibrační křivky pro stanovení koncentrace nanočástic**

Sada standardů byla připravena ředěním 1:100 (10 mikrolitrů do 1 ml), poté ředění 1:10 byla připravena disperze nanočástic zředěná 1000krát. Ze vzniklé soustavy bylo připraveno 5ml zásobního nanodisperze zředěné 10 000krát, jedná se

o koncentraci 0,00005 % (tj. 0,5 ppm, případně  $5 \cdot 10^{-7}$ ). Připravena byla řada 11 standardů odstupňovaná od nulové koncentrace s přírůstkem 10 % koncentrace zásobního roztoku.

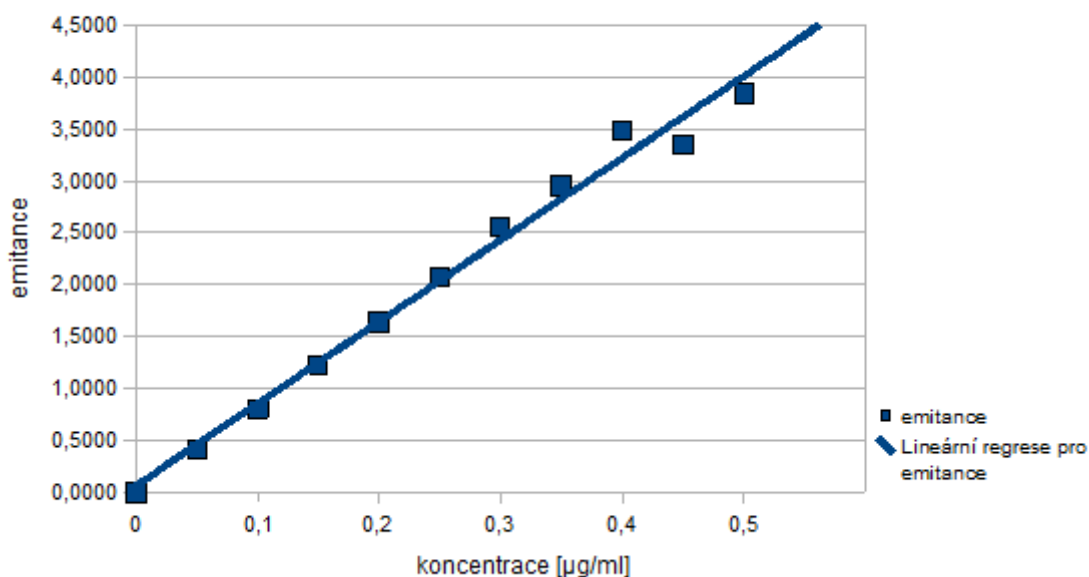
Měření proběhlo s trojím opakováním měření vzorku standardu. Během kalibrace byly přeměřeny i vzorky destilované vody, která byla použita při oplachování měřících kyvet. Destilovaná voda se od vzorku pufru žádným způsobem nelišila. Rozdíl mezi nimi nebyl při měření patrný.

**Tab. 1:** Koncentrace standardů a hodnoty emitance

Koncentrace [µg/ml]	Emitance				
	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr	Odečtené
0,50	10,10	10,00	10,01	10,04	<b>3,84</b>
0,45	9,51	9,62	9,52	9,55	<b>3,35</b>
0,40	9,68	9,80	9,57	9,68	<b>3,49</b>
0,35	9,18	9,18	9,09	9,15	<b>2,96</b>
0,30	8,76	8,72	8,78	8,75	<b>2,56</b>
0,25	8,31	8,33	8,17	8,27	<b>2,08</b>
0,20	7,86	7,78	7,86	7,84	<b>1,64</b>
0,15	7,49	7,44	7,32	7,42	<b>1,22</b>
0,10	6,99	7,04	6,95	6,99	<b>0,80</b>
0,05	6,58	6,64	6,59	6,60	<b>0,41</b>
0,00	6,23	6,21	6,15	6,19	<b>0,00</b>

**V Tab. 1** jsou v prvním sloupci uvedeny koncentrace standardů. 2. až 4. sloupec uvádí naměřené hodnoty emitance při třech měřeních téhož standardu. 5. sloupec obsahuje aritmetický průměr z předchozích 3 sloupců. Poslední sloupec obsahuje hodnotu získanou odečtením aritmetického průměru 3 měření daného standardu a aritmetického průměru 3 měření slepého vzorku. Výsledná závislost hodnot emitance na koncentraci je ilustrována na **Obr. 12**.

### Kalibrační závislost emitance na koncentraci nanočástic Chromeon 470



**Obr. 12:** Kalibrační závislost emitance fluorescenčně značených nanočástic Chromeonu 470 na koncentraci v akceptorovém pufru pH

Příslušná rovnice regresní přímky má tvar:  $y = 8,06 x$  (1)

ve které  $y$  značí emitanci a  $x$  zastupuje koncentraci vyjádřenou v jednotkách  $\mu\text{g/ml}$

Koeficient determinace provedené lineární regrese:  $R^2 = 0,9872$

#### 4.4.6 Permeační pokus č. 2 (23. 5. 2011)

Poučením pro druhou sadu měření bylo, že je třeba omezit vyschnutí vzorků, proto bylo krycí sklíčko nalepeno přímo na horní díl vymezovacího rámečku pod klobouček. Pro pokus byl použit zbytek podjazykové membrány z prvního pokusu. Vlastní pokus byl poznamenán několika praktickými nezdary. Hned po usazení jazyka na permeační celu č. 1 bylo zjištěno, že netěsní podjazyková membrána, zjevně z důvodu nedostatečné velikosti, která neumožňovala zajištění stabilní pozice na permeačním otvoru. Z tohoto důvodu byl vzorek přesazen na permeační celu s menším otvorem ( $1 \text{ cm}^2$ ).



Každá následná manipulace se vzorkem membrány má za důsledek potřísnění permeační plochy silikonovým tukem, který fixuje membránu mezi skly. Byla sice snaha tuk odstranit vatovou tyčinkou, dá se ale předpokládat, že úplné vyčištění by vyžádalo drastičtější postup a proto je možné se domnívat, že membrána mohla zůstat znečištěná, což se mohlo projevit v následném chování membrány během pokusu. Poslední permeační cela byla usazena na destičku s menším permeačním otvorem hned. Lázeň byla temperována na 36,5 °C. Naneseno bylo opět 200 mikrolitrů roztoku nanočástic Chromeon 470. Odběry probíhaly ve stejných intervalech jako u předchozího pokusu.

Nasazení krycího sklíčka přímo na sklíčko s permeačním otvorem se osvědčilo, vzorek zůstal po celou dobu dostatečně hydratován. V době začátku pokusu ještě nebyla analytická metoda vyladěná, a proto nebylo možné využít možnosti, které se naskytly po zpřesnění detekce, konkrétně zkrácení permeačního pokusu z důvodu dostatečné detekce už po kratším časovém intervalu. Z tohoto důvodu i z důvodu současného měření budou výsledky dvou sad měření prezentovány v **Tab. 2** a **3** společně.

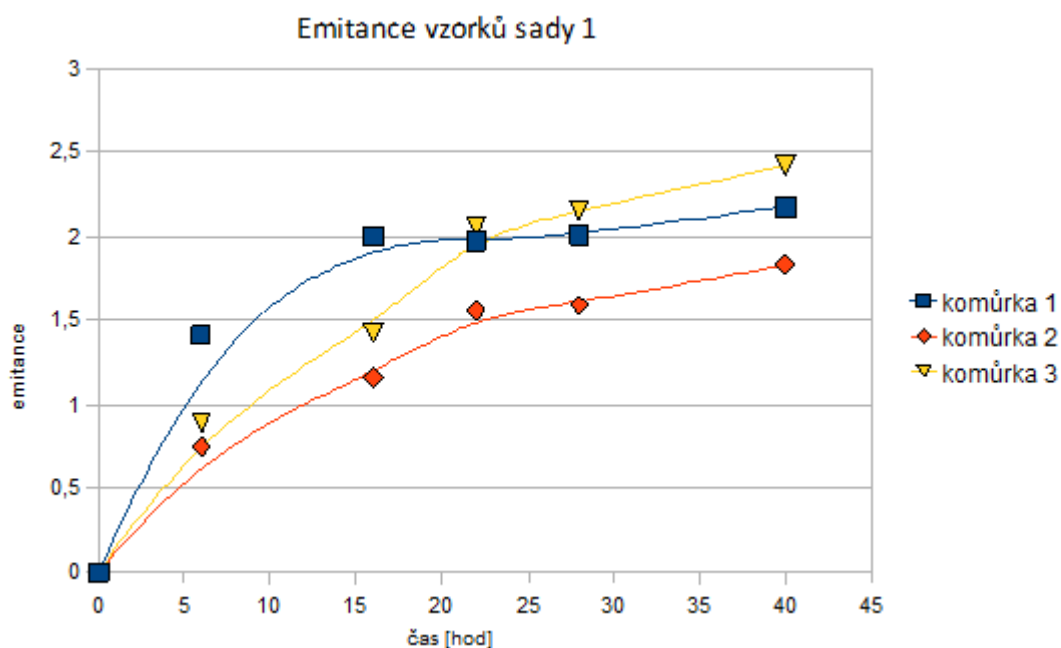
#### 4.4.7 Výsledky pilotních permeačních pokusů

**Tab. 2:** Hodnoty emitance vzorků sady 1

Čas odběru [hod]	Emitance		
	komůrka 1	komůrka 2	komůrka 3
6	1,41	0,75	0,89
16	2,00	1,16	1,42
22	1,97	1,56	2,05
28	2,01	1,59	2,15
40	2,17	1,83	2,42

**Tab. 3:** Hodnoty emitance vzorků sady 2

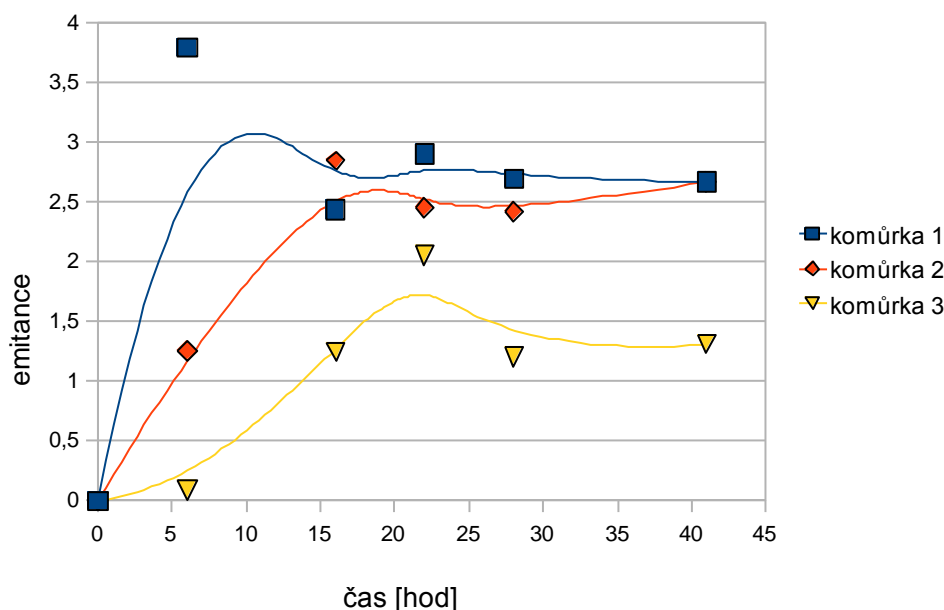
Čas odběru [hod]	Emitance		
	komůrka 1	komůrka 2	komůrka 3
6	3,79	1,25	0,09
16	2,43	2,85	1,24
22	2,90	2,45	2,05
28	2,69	2,42	1,20
41	2,67	2,67	1,31



**Obr. 13:** Emitance vzorků 1-3 první sada

V grafu na **Obr. 13** jsou naneseny hodnoty emitance naměřené při 470 nm po odečtení hodnoty slepého vzorku, která byla naměřena na začátku měření. Na základě takto získaných hodnot je možné podle kalibrační křivky určit koncentrace a určit rychlost permeace částic přes membránu. Vzhledem k technickým problémům naznačeným výše a také malému počtu použitelných hodnot nebyly rychlostní parametry vyčísleny. Přes tyto vývojové nedostatky vzestupy emitance vzorků naznačují poměrně slibnou permeaci nanočástic po celou dobu trvání experimentu. Už první odběr po 6 hodinách obsahuje dostatečnou koncentraci nanočástic pro jejich spolehlivou detekci.

### Emitance odebraných vzorků sady 2 v závislosti na čase odběru



**Obr. 14:** Emitance vzorků 1 až 3 z druhé sady

Při interpretaci výsledků druhé sady vzorků je třeba vzít v potaz, že komůrky 1 a 3 měly poloviční permeační plochu a celkově fakt, že sestavování permeačních cel provázely problémy. Přes všechny problémy, které se vyskytly během pilotních permeačních pokusů, je možné přesvědčivě říct, že zkoumané nanočástice přes sublingvální membránu procházejí. Získané poznatky byly uplatněny v konstrukci hlavního permeačního pokusu, který si dal za cíl určit rychlost prostupu nanočástic přes membránu.

## 4.5 Kalibrační křivka pro hlavní sérii měření

Byly připraveny 3 řady standardů o vzestupných koncentracích od 0 do 0,5  $\mu\text{g/ml}$  se vzestupem po 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . Vzhledem nezávislému procesu ředění každé jednotlivé řady standardů bylo možno ověřit i spolehlivost přípravy standardů. Dvojím

ředěním 1:100 byl připraven základní standard 0,5 µg/ml. Tato koncentrace standardu odpovídá při nanášce 100 µl dvouprocentnímu průchodu přes membránu.

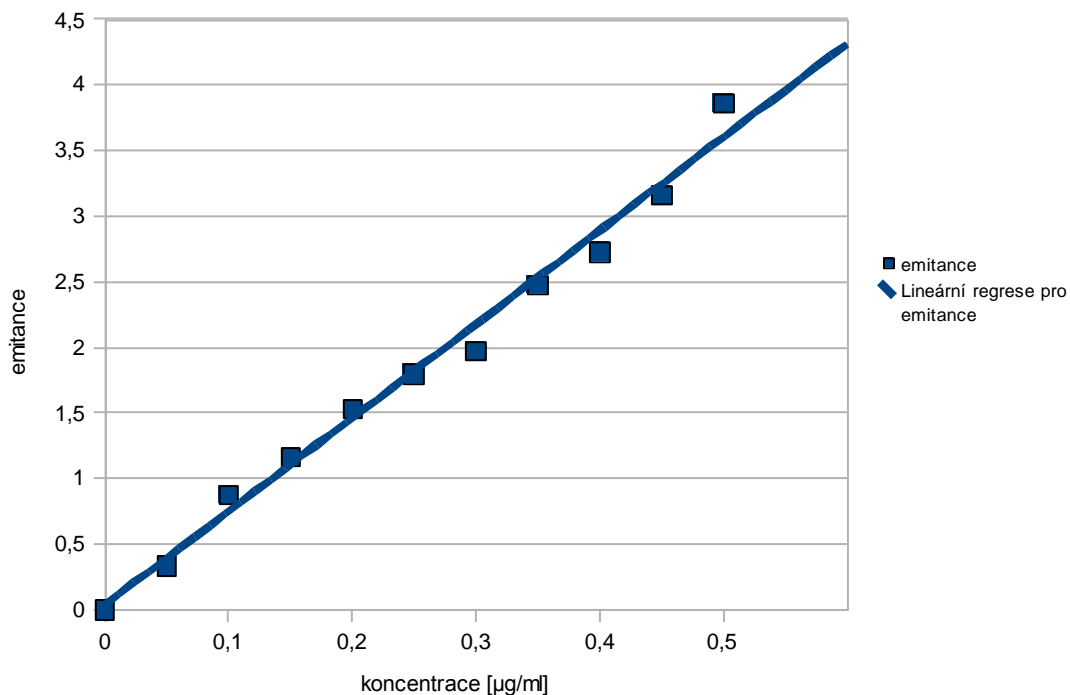
Tento základní standard byl dále používán k přípravě standardů jiných koncentrací. U řady 1 bylo podceněno potřebné množství základního standardu, proto byl připravován nadvakrát, což se projevilo schodkem v kalibrační křivce. U řady 1 byla provedena 3 měření emitance každého standardu. Tento postup se ale ukázal být časově příliš zdlouhavý, a proto řady standardů 2 a 3 byly měřeny jen jednou. Měřící cyklus měl ale 75 opakování, aby získaná hodnota měla stejnou váhu jako průměr ze tří měření řady 1 po 25 opakováních. Hodnota slepého vzorku u třetí řady vykazuje značnou odchylku oproti hodnotám ostatních slepých vzorků i proti nejbližšímu standardu své řady, a proto byla jako chybná ze souboru vyloučena. Získané hodnoty standardů jsou shrnuty v následující **Tab. 4** a znázorněny na **Obr. 15** kalibrační křivkou.

**Tab. 4:** Naměřené hodnoty emitance Chromeonu 470 v závislosti na koncentraci standardu

Koncentrace	Emitance							
[µg/ml]	1a	1b	1c	1	2	3	průměr	odečtená
0,00	5,28	5,29	5,19	5,25	5,55	vyřazen	5,40	<b>0,00</b>
0,05	5,48	5,40	5,47	5,45	5,94	5,81	5,73	<b>0,33</b>
0,10	5,92	5,96	5,94	5,94	6,54	6,35	6,28	<b>0,87</b>
0,15	6,11	6,09	6,03	6,08	6,81	6,81	6,57	<b>1,16</b>
0,20	6,78	6,81	6,82	6,80	6,99	6,99	6,93	<b>1,53</b>
0,25	7,18	7,16	7,21	7,18	7,01	7,41	7,20	<b>1,80</b>
0,30	6,90	6,92	6,80	6,87	7,26	7,98	7,37	<b>1,97</b>
0,35	7,48	7,39	7,44	7,44	7,89	8,30	7,88	<b>2,47</b>
0,40	7,69	7,50	7,57	7,59	8,17	8,63	8,13	<b>2,73</b>
0,45	8,37	8,44	8,19	8,33	8,63	8,72	8,56	<b>3,16</b>
0,50	9,34	9,49	9,32	9,38	8,59	9,82	9,26	<b>3,86</b>

V tabulce jsou uvedeny koncentrace standardů a hodnoty emitance těchto standardů. Sloupce „1a“, „1b“, „1c“ obsahují dílčí měření kalibrační sady 1, jejichž průměr je uveden ve sloupci s popisem „1“. Sloupce označené „2“ a „3“ uvádějí výsledky rozšířeného měření o 75 opakováních u kalibračních sad 2 a 3. Sloupec „průměr“ obsahuje průměr naměřených hodnot standardů všech tří kalibračních sad. Rozdíl mezi průměrem hodnoty emitance standardů a slepých vzorků je ve sloupci „odečtená“.

Kalibrační závislost emitance nanočástic Chromeon 470 na koncentraci  
pro závěrečný permeační pokus



**Obr. 15:** Kalibrační křivka nanočástic Chromeonu 470 pro závěrečné měření

Z uvedených údajů i porovnáním obou kalibračních křivek na **Obr. 12 a 15** můžeme dojít k závěru, že stanovení fluorescenčně značených nanočástic Chromeon 470 je dostatečně spolehlivé. Koeficient determinace  $R^2 = 0,9875$  nabyl dostatečné úrovně.

Rovnice regresní přímky  $y = 7,2046 x$  (2)

## 4.6 Hlavní sada permeací začínající 6. 10. 2011

### 4.6.1 Průběh permeačního pokusu

Permeačního pokusu se účastnilo 10 buněk. V plánu bylo v průběhu pokusu 5 buněk rozebrat a odeslat na mikroskopické měření, které by mělo být schopné napovědět, jakými cestami nanočástice skrz sliznici jazyka procházejí. Ke dnešnímu datu však výsledky mikroskopie nejsou známy (vzorky jsou stále zamražené). Zbývajících 5 buněk bylo použito ke kvantitativnímu zhodnocení permeace.

#### Parametry permeační soustavy

Podjazyková membrána: s datem 12. 4. 2011

Průměr permeačního otvoru: 2 cm<sup>2</sup>.

Donorová fáze: 100 mikrolitrů Chromeon 470

Akceptorová fáze: izotonický fosfátový pufr pH 7,4

Doba permeace: 24 hodin

Odebíráno bylo vždy 0,7 ml akceptorové fáze, jež bylo nahrazováno tím samým objemem fosfátového pufru pH 7,4 temperovaného při stejné teplotě jako pokusné komůrky. V případě poklesu hladiny pufr doplněn po značku, která vyznačovala počáteční stav hladiny. Nejvyšší doplněné množství nad rámec odebraného bylo 0,1 ml.

#### Časový harmonogram experimentu

7:40 začátek kompletace komůrek, současně zahájena temperace lázně

8:35 začátek nanášení vzorků

## Termíny odběrů

- |              |   |
|--------------|---|
| 1. po 1 hod  | 9:35 – odběr komůrky – zůstává 9 komůrek  |
| 2. po 2 hod  | 10:35 – odběr komůrky – zůstává 8 komůrek |
| 3. po 4 hod  | 12:35 – odběr komůrky – zůstává 7 komůrek |
| 4. po 6 hod  | 14:35 – odběr komůrky – zůstává 6 komůrek |
| 5. po 8 hod  | 16:35 – odběr komůrky – zůstává 5 komůrek |
| 6. po 10 hod | 18:35 – bez odebrání komůrky              |
| 7. po 12 hod | 20:35 – bez odebrání komůrky              |

## Poznámky ke stavu sestavených permeačních cel

komůrka č. 4 byla po okrajích zamaštěnější od silikonového tuku, očištěná vatou

komůrka č. 5 zamaštěnější okraj na jedné straně ve tvaru měsíčku

komůrka č. 9 protékala, popotáhnuta, očištěna

komůrka č. 10 měla menší permeační otvor ( $1\text{cm}^2$ ) - rizikovější – po hodině odebrána –  
tj. bez závad

## Poznámky k odběrům vzorků akceptorové fáze

odběr č. 1 – proběhl bezproblémově

odběr č. 2 – z několika vzorků vyhnány menší bublinky nevýznamné velikosti

odběr č. 3 – z cely 2 odstraněna drobná bublina

odběr č. 4 – proběhl bezproblémově

odběr č. 5 – proběhl bezproblémově

odběr č. 6 – z cely 2 odstraněna jedna bublina malé velikosti

#### 4.6.2 Měření permeačních vzorků, nestabilita slepého vzorku

Odebrané vzorky byly náležitě označovány číslem komůrky a hodinou odběru. Vzorky byly v mezidobí mezi odběry přímo analyzovány na fluorescenčním spektrofotometru. Ze začátku měření se autor snažil zjistit příčinu odlišných hodnot slepých vzorků, naměřených jinými pracovníky, avšak nebyla zjištěna příčina rozdílnosti naměřených hodnot. Zkoušeny byly obě měřící kyvety, různé možnosti ovlivnění (varianty zahrnující různé způsoby vysušení kyvet po čištění a vypláchnutí kyvet lihem).

Vlastní měření probíhalo v průběhu dne mezi odběry od 15 do 21 hodin. Během měření bylo zjištěno, že hodnoty neodpovídají očekávání a po změření vzorků z dvou sad odběrů byl zjištěn značný posun hodnoty slepého vzorku. Proto byl později slepý vzorek častěji přeměřován. Bylo zjištěno, že hodnota slepého vzorku vykazuje značnou nestabilitu, ovšem ve vývoji této hodnoty je možné najít poměrně jasný trend. Během večerního měření se projevil trend klesavý. Ráno po opětovném spuštění fluorescenčního spektrofotometru byl tento trend naopak stoupavý. Tento jev je dokumentován na **Obr. 15**. V průběhu celého diplomové práce se hodnoty emitance slepého vzorku pohybovaly v rozmezí 3,09 až 6,23. Přes tento značný rozptyl bylo při měření kalibračních křivek zjištěno, že její parametry nejsou absolutní hodnotou slepého vzorku dotčeny.

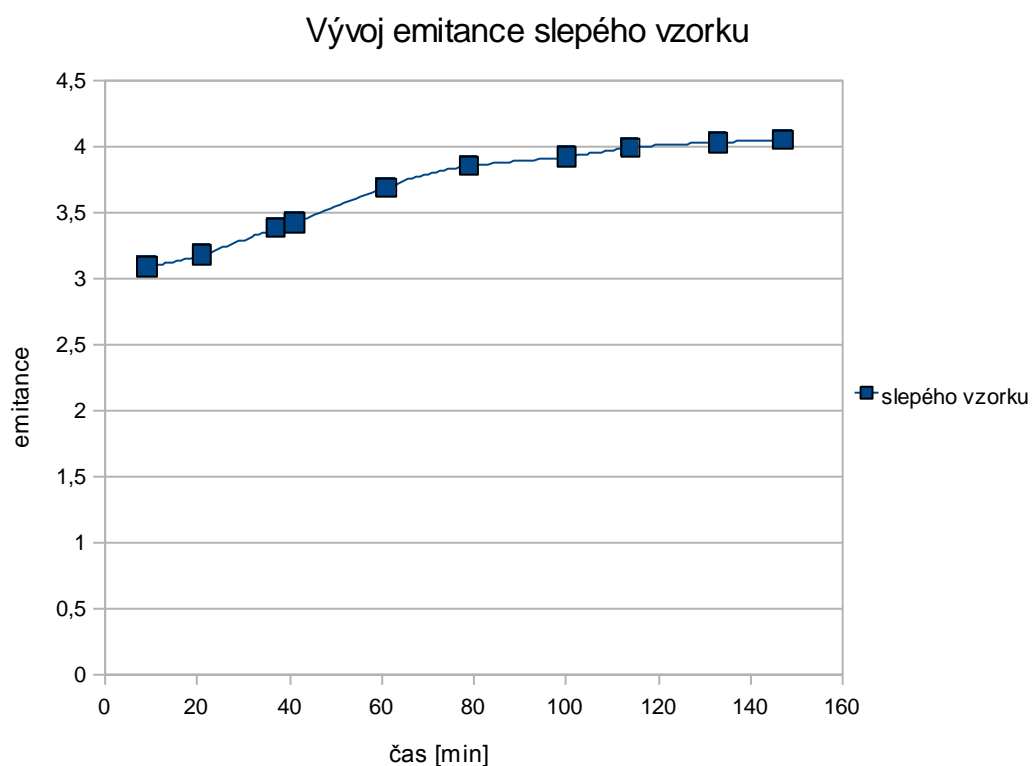
Vysvětlení tohoto jevu zatím chybí, předpokládám vliv teploty přístroje (možná i v závislosti na teplotě prostředí), popř. vliv teploty na vzorky, protože měřící komora není termostatována.

Měření, které provedl ing. Vladimír Kubíček, dokládá, že čidlo poskytuje signál v čase prakticky neměnný, a příčinu nestability signálu je třeba hledat buď v lampě či přímo ve vzorku.



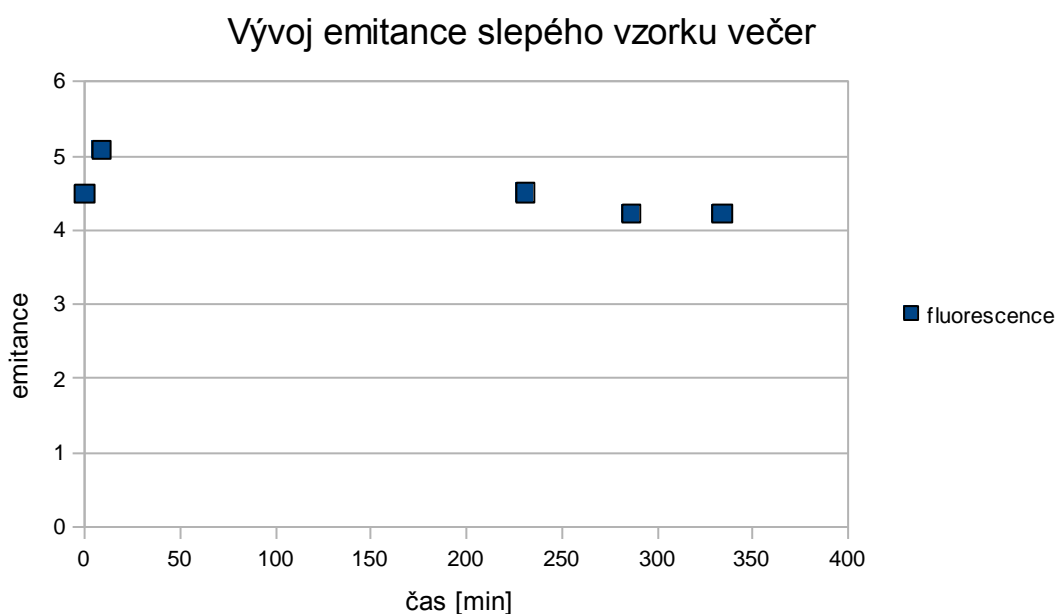
**Tab. 5:** Hodnoty emitance slepého vzorku v závislosti na čase od startu přístroje

Čas [min]	Emitance slepého vzorku
9	3,09
21	3,18
37	3,38
41	3,42
61	3,69
79	3,85
100	3,92
114	3,99
133	4,03
147	4,05



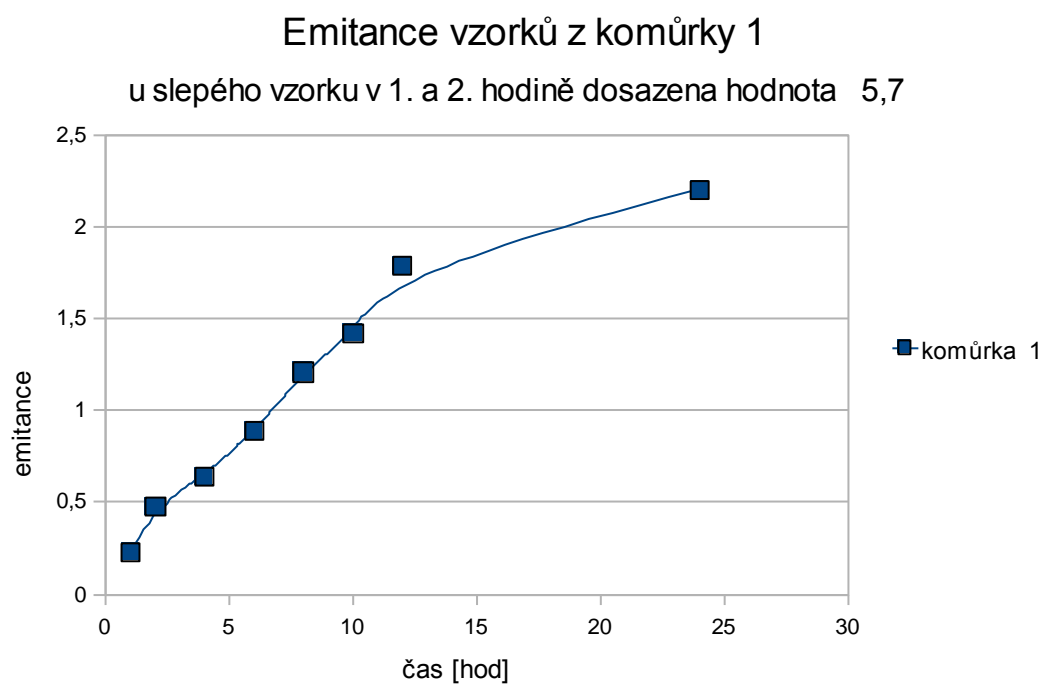
**Obr. 15:** Vývoj hodnoty emitance slepého vzorku v závislosti na čase od spuštění dne 7. 10. 2011

Z obrázku vyplývá, že vývoj hodnoty emitance slepého vzorku je i přes svou nestabilitu dobře předvídatelný a dá se tedy usuzovat, že za předpokladu pravidelné kontroly hodnoty slepého vzorku mají naměřené hodnoty emitance dostatečnou validitu. S výhradami lze přistupovat k hodnotám získaným během prvních 2 sad vzorků, tedy před tím, než byl rozpoznán vliv změny slepého vzorku. Vzorky z prvních dvou hodin jsou porovnávány se slepým vzorkem ve fázi záhřevu přístroje.



**Obr. 16:** Hodnoty emitance slepého vzorku zaznamenané během večerního měření

Pokud by se vzal v potaz trend změny u prvních dvou slepých vzorků, kdy během 9 minut došlo k vzestupu hodnoty o 0,58 jednotky, je možné usuzovat, že reálná hodnota mohla být značně vyšší. Pokud by vzestup hodnoty slepého vzorku pokračoval ve změně, jež byla zaznamenána mezi prvním a druhým měřením slepého vzorku, dalo by se hovořit o úplné linearizaci permeačních grafů (**Obr. 17**).



**Obr. 17:** Hodnoty emitance vzorků z komůrky 1 při dosazení emitance slepého vzorku 5,7 pro první dvě sady odběrů.

# 5 VÝSLEDKY HLAVNÍ SÉRIE MĚŘENÍ

Výsledky měření jsou shrnuty v následující **Tab. 6** a **Obr. 18**. Pro účely výpočtu permeační rychlosti nanočástic Chromeon 470 bude použita střední pasáž permeace, kde je už dobře ošetřen vliv nestálého slepého vzorku. Vzorek z komůrky 5 po první hodině byl znehodnocen rozlitím během měření, tudíž nebude v tabulkách uveden.

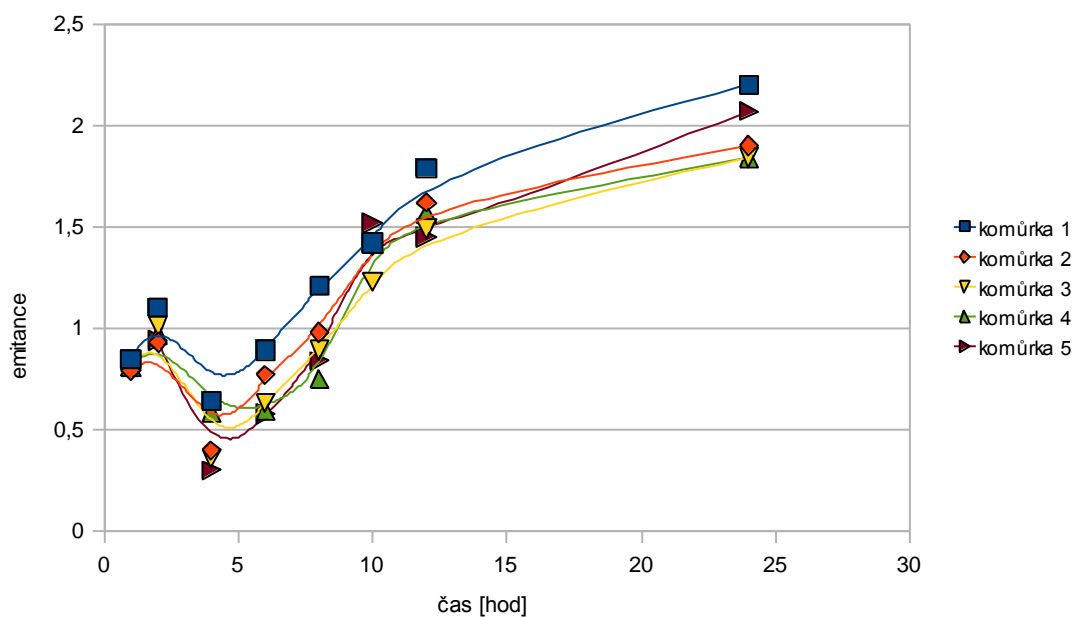
**Tab. 6:** Naměřené hodnoty emitance vzorků z permeace a slepých vzorků

Emitance vzorků finální série experimentu					
Čas odběru [hod]	Komůrka 1	Komůrka 2	Komůrka 3	Komůrka 4	Komůrka 5
1	5,93	5,87	5,90	5,89	vyřazen
2	6,18	6,01	6,09	6,05	6,02
4	5,72	5,48	5,44	5,67	5,38
6	5,40	5,28	5,14	5,11	5,09
8	5,43	5,20	5,11	4,97	5,06
10	5,11	5,10	4,92	5,11	5,37
12	5,64	5,47	5,41	5,48	5,44
24	6,19	5,89	5,87	5,87	6,12

Přiřazené emitance slepého vzorku, které byly odečteny od emitance vzorků					
Čas odběru [hod]	Komůrka 1	Komůrka 2	Komůrka 3	Komůrka 4	Komůrka 5
1	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08
2	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08
4	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08
6	4,51	4,51	4,51	4,51	4,51
8	4,22	4,22	4,22	4,22	4,22
10	3,69	3,69	3,69	3,69	3,85
12	3,85	3,85	3,92	3,92	3,99
24	3,99	3,99	4,03	4,03	4,05

Hodnoty emitance vzorků po odečtení slepého vzorku					
Čas odběru [hod]	Komůrka 1	Komůrka 2	Komůrka 3	Komůrka 4	Komůrka 5
1	0,85	0,79	0,82	0,81	vyřazen
2	1,10	0,93	1,01	0,97	0,94
4	0,64	0,40	0,36	0,59	0,30
6	0,89	0,77	0,63	0,60	0,58
8	1,21	0,98	0,89	0,75	0,84
10	1,42	1,41	1,23	1,42	1,52
12	1,79	1,62	1,49	1,56	1,45
24	2,20	1,90	1,84	1,84	2,07

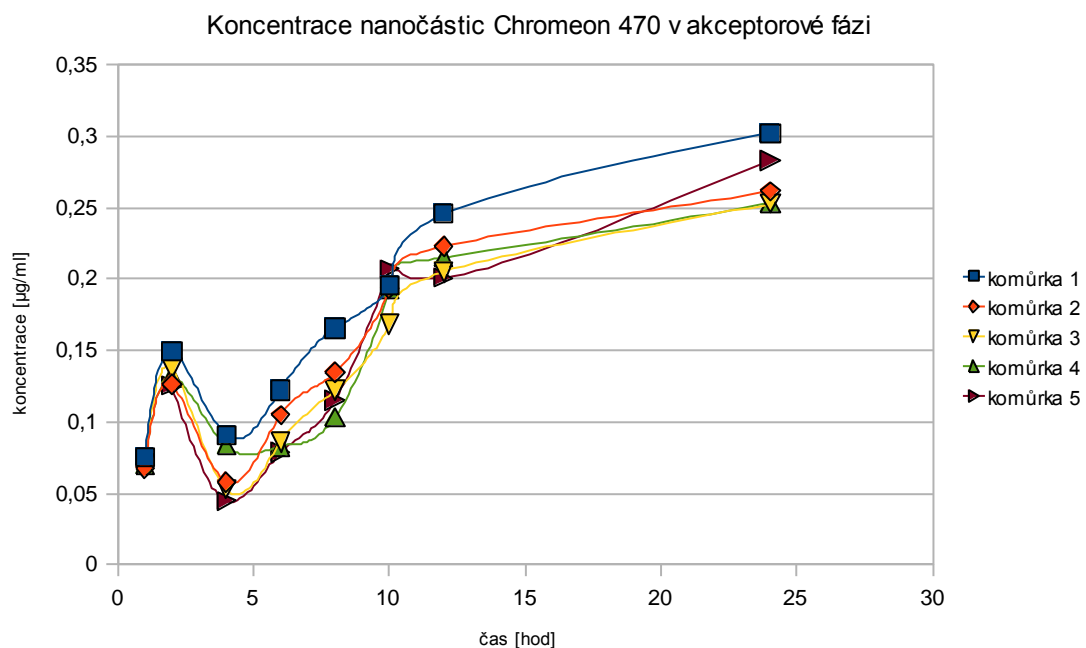
### Emitance vzorků permeačního pokusu s nanočásticemi Chromeon 470



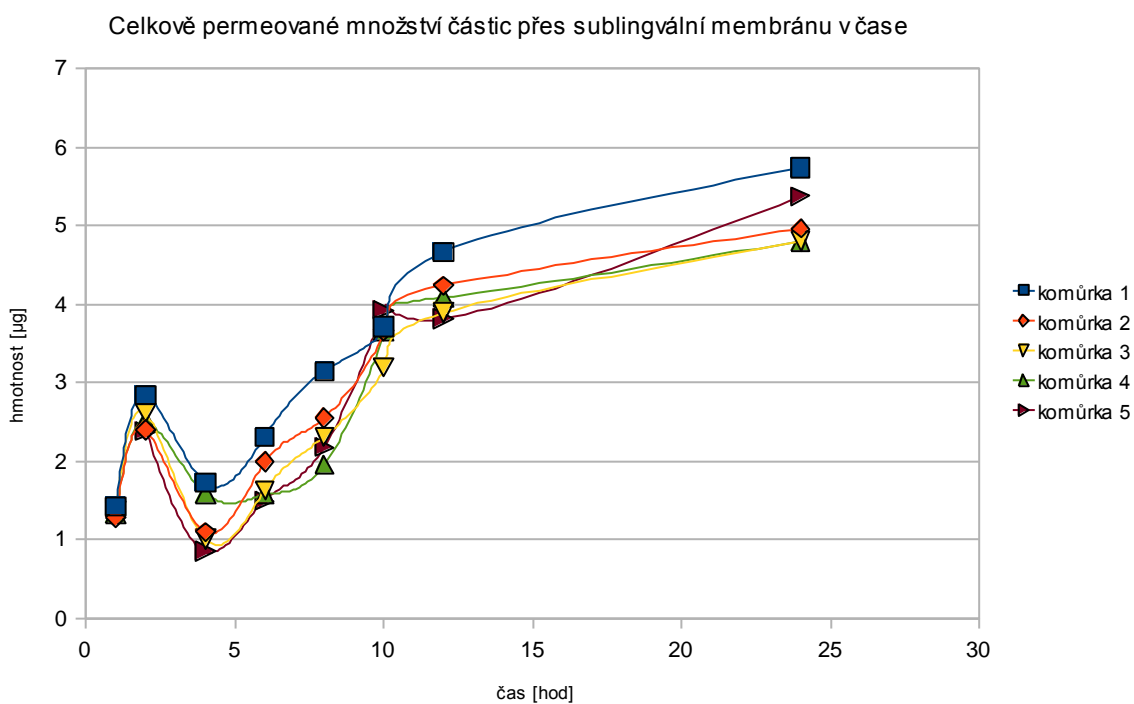
**Obr. 18:** Průběh emitance vzorků v závislosti na čase odběru

Pomocí odečtu z kalibrační křivky (**Obr. 15**) byly určeny koncentrace vzorků a hmotnost nanočástic, které překonaly sublingvální bariéru. Byl dopočítán vliv odběru vzorků a získaná data jsou prezentována v následujících grafech na **Obr. 19 a 20**.

Celkově permeované množství nanočástic odpovídá součtu množství nanočástic v aktuálním vzorku a množství už odebraného ve všech předcházejících intervalech.



**Obr. 19:** Koncentrace nanočástic v akceptorové části v závislosti na čase po započtení vlivu odběrů



**Obr. 20:** Kumulativní hmotnost permeovaných nanočástic Chromeon 470 v závislosti na čase

Vzhledem k poměrně lineární části permeační křivky v úseku mezi 4. a 12. hodinou je možné stanovit rychlost permeace přes sublingvální sliznici a tuto vztáhnout k ploše sliznice.

**Tab. 7:** Průměrná rychlost permeace nanočástic Chromeon 470 mezi 4. a 12. hodinou běhu experimentu.

**Průměrná rychlost permeace mezi 4. a 12. hodinou**

Komůrka	1	2	3	4	5
Rychlost permeace [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{hod}^{-1}$ ]	0,184	0,196	0,180	0,156	0,186

Průměrná rychlost permeace nanočástic Chromeon 470 přes sublingvální membránu během střední části experimentu odpovídá  $(0,18 \pm 0,01) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{hod}^{-1}$ . Hodnoty rychlostí permeace nanočástic i celkově permeované množství nanočástic jsou v poměrně úzkém rozmezí, což naznačuje poměrně nízkou variabilitu prostupnosti jednotlivých vzorků.

## 6 ZÁVĚR

Získaná data svědčí pro poznatek, že i 40nm nanočástice mají schopnost procházet přes sublingvální membránu. Omezením tohoto pokusu bylo použití mražených preparátů, u kterých existuje možnost, že zmrazení změnilo prostupnost sliznice. Měření, které provedli jiní pracovníci, však naznačují, že prostupnost čerstvých membrán je sice nižší, ale je zachovaná. Bohužel měření proběhla před objevem nestálosti slepého vzorku, a proto je přesnost stanovení omezená.

Tyto zjištění jsou v souladu s poznatky jiných autorů, že tato velikost nanočástic má schopnost procházet jak vrstvou hlenu, tak samotnou sliznicí. S konkrétními výsledky sublingvální permeace nanočástic však není možné dosažené výsledky srovnat, neboť na běžně dostupných vědeckých databázích není možné vyhledat podobně zaměřené výzkumné práce.

Metoda měření pomocí spektrofleurometru se ukázala být dosti citlivá a přesná i pro stanovení nízkých hladin fluorescenčně značených nanočástic. Pro následný výzkum je ale třeba vyřešit problém s nestabilitou slepého vzorku, nejlépe zjištěním, které rušivé vlivy stojí za jeho značně variabilní hodnotou, a eliminací těchto vlivů (termostatování měřicí komory atd.). Alternativním řešením problému by byla možnost měřit vzorek zároveň se slepým vzorkem v spektrofleurometru, který by to umožňoval. Další možností je pravidelné proměřování slepého vzorku vkládáním mezi vzorky.



# 7 LITERATURA

<sup>1</sup> Hearnden, V.; Sankar, V.; Hull, K.; Juras, D. V.; Greenberg, M.; Kerr, A. R.; Lockhart, P. B.; Patton, L. L.; Porter, S.; Thornhill, M. H. New Developments and Opportunities in Oral Mucosal Drug Delivery for Local and Systemic Disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64 , 16–28.

<sup>2</sup> Patel, V. F.; Liu, F.; Brown, M. B. Advances in Oral Transmucosal Drug Delivery. *J. Control. Rel.* **2011**, 1-11

<sup>3</sup> Smart, J. D. Lectin-mediated Drug Delivery in the Oral Cavity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, 481–489.

<sup>4</sup> Herrera, J. L.; Lyons, M. F.; Johnson, L. F. Saliva: Its Role in Health and Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **1988**, 10, 569–578.

<sup>5</sup> Slomiany, B. L.; Murty, V. L.; Piotrowski, J.; Slomiany, A. Salivary Mucins in Oral Mucosal Defence. *Gen. Pharmac.*, **1996**, 27, 761–771.

<sup>6</sup> Gilles, P.; Ghazali, F. A.; Rathbone, J. Systemic Oral Mucosal Drug Delivery Systems and Delivery Systems, *Oral Mucosal Drug Delivery*, Marcel Dekker Inc, New York, **1996**, 74, 241–285.

<sup>7</sup> Squier, C. A.; Wertz, P. W. Structure and Function of the Oral Mucosa and Implications for Drug Delivery, in: Rathbone, M. J. (Ed.), *Oral Mucosal Drug Delivery*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1996**, 74, 1–26.

<sup>8</sup> Consuelo, I. D.; Jacques, Y.; Pizzolato, G.; Guy, R. H.; Falson, F. Comparison of the Lipid Composition of Porcine Buccal and Esophageal Permeability Barriers, *Arch. Oral Biol.*, **2005**, 50, 981–987.

<sup>9</sup> Humphrey, S. P.; Williamson, R. T. A Review of Saliva: Normal Composition, Flow and Function, *J. Prosthet. Den.*, **2001**, 85, 162–169.

- <sup>10</sup> Gandhi, R. B.; Robinson, J. R. Oral Cavity as a Site for Bioadhesive Drug Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1994**, 13, 43–74.
- <sup>11</sup> Hayward, A. F. Membrane-coating Granules, *Int. Rev. Cyt.*, **1979**, 59, 97–127.
- <sup>12</sup> Salamat-Miller, N.; Chittchang, M.; Johnston, T. P. The Use of Mucoadhesive Polymers in Buccal Drug Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 1666–1691.
- <sup>13</sup> Allen, A. The Gastrointestinal Physiology. Salivary, Gastric and Hepatobiliary Secretions, in: Forte, J. G. (Ed.), *Handbook of Physiology*, Vol. III Section 6, American Physiological Society, Bethesda, MD, **1989**, 359–382.
- <sup>14</sup> Norris, D. A.; Puri, N.; Sinko, P. J. The Effect of Physical Barriers and Properties on the Oral Absorption of Particulates, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1998**, 34, 135–154.
- <sup>15</sup> Pigman, W.; Moshera, J. L. The Nature and Function of the Epithelial Mucous Glycoproteins, in: Blandau, R. J.; Moghissi, K. (Eds.), *The Biology of the Cervix*, University of Chicago Press, Chicago, **1973**, 143–172.
- <sup>16</sup> Carlson, D. Structures and Immunochemical Properties of Oligosaccharides Isolated from Pig Submaxillary Mucins, *J. Biol. Chem.*, **1968**, 243 (3), 616–626.
- <sup>17</sup> Khanvilkar, K.; Donovan, M. D.; Flanagan, D. R. Drug Transfer through Mucus, *Adv. Drug Del. Rev.*, **2001**, 48, 173–193
- <sup>18</sup> Cu, Y.; Saltzman, W. M. Mathematical Modeling of Molecular Diffusion through Mucus, *Adv. Drug Del. Rev.*, **2009**, 61, 101–114
- <sup>19</sup> Bataillon, V.; Lhermitte, M.; Lafitte, J. J.; Pommery, J.; Roussel, P. The Binding of Amikacin to Macromolecules from the Sputum of Patients Suffering from Respiratory Diseases, *J. Antimicrob. Chemother.*, **1992**, 29, 499–508.
- <sup>20</sup> Niibuchi, J.-J.; Aramaki, Y.; Tsuchiya, S. Binding of Antibiotics to Rat Intestinal Mucin, *Int. J. Pharmaceutics*, **1986**, 30, 181–187.

- <sup>21</sup> Bolister, N.; Basker, M.; Hodges, N. A.; Marriott, C. The Diffusion of Beta-lactam Antibiotics through Mixed Gels of Cystic Fibrosis-derived Mucin and *Pseudomonas Aeruginosa* Alginate, *J. Antimicrob. Chemother.*, **1991**, 27, 285–293.
- <sup>22</sup> <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/43187?lang=en&region=GB> (online 1/5/2012)
- <sup>23</sup> Ron, N.; Theis, C. Nanoparticle Transport in Gels Including Mucus, *Proc. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, **1998**, 25, 376–377.
- <sup>24</sup> Olmsted, S. S.; Padgett, J. L.; Yudin, A. I.; Whaley, K. J.; Moench, T. R.; Cone, R. A. Diffusion of Macromolecules and Virus-like Particles in Human Cervical Mucus, *Biophys. J.*, **2001**, 81, 1930–1937.
- <sup>25</sup> Szentkuti, L. Light Microscopical Observations on Luminally Administered Dyes, Dextran, Nanospheres and Microspheres in the Pre-epithelial Mucus Gel Layer of the Rat Distal Colon, *J. Controlled Release*, **1997**, 46, 233–242.
- <sup>26</sup> Norris, D. A.; Sinko, P. J. Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity on the Translocation of Polystyrene Micro-spheres through Gastrointestinal Mucin, *J. Appl. Polymer Sci.*, **1997**, 63, 1481–1492.
- <sup>27</sup> Lai, S. K.; Wang, Y.-Y.; Hanes, J. Mucus-penetrating Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Mucosal Tissues, *Adv. Drug Del. Rev.*, **2009**, 61, 158–171
- <sup>28</sup> Lai, S. K.; O'Hanlon, D. E.; Harrold, S.; Man, S. T.; Wang, Y. -Y.; Cone, R.; Hanes, J. Rapid Transport of Large Polymeric Nanoparticles in Fresh Undiluted Human Mucus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, 104, 1482–1487.
- <sup>29</sup> de la Fuente, M.; Csaba, N.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. Nanoparticles as Protein and Gene Carriers to Mucosal Surfaces, *Nanomedicine*, **2008**, 3, 845–857.
- <sup>30</sup> Edeling, M. A.; Smith, C.; Owen, D. Life of a Clathrin Coat: Insights from Clathrin and AP Structures. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2006**, 7, 32–44.

- <sup>31</sup> Xiang, S. D.; Scholzen, A.; Minigo, G.; David, C.; Apostolopoulos, V.; Mottram, P. L.; Plebanski, M.; Pathogen Recognition and Development of Particulate Vaccines: does size matter? *Methods*, **2006**, 40, 1–9.
- <sup>32</sup> Mayor, S.; Pagano, R. E. Pathways of Clathrin-independent Endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2007**, 8, 603–612.
- <sup>33</sup> Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-mediated Endocytosis, *Biochem. J.*, **2004**, 377, 159–169.
- <sup>34</sup> Hoogstraate, A. J.; Boddé, H. E. Methods for Assessing the Buccal Mucosa as a Route of Drug Delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, **1993**, 12, 99-125

## 8 DOKUMENTACE

### 8.1 Vysvětlení zkratk použitých v protokolech

$c_{nk}$  [ $\mu\text{g/ml}$ ] = nekorigovaná koncentrace

$c_k$  [ $\mu\text{g/ml}$ ] = korigovaná koncentrace; zohledňuje průběžný odběr a doplňování akceptorové fáze

$Q_t = Q_{t(\text{exp})}$  [ $\mu\text{g/cm}^2$ ] = množství látky, které se projde membránou o ploše  $1 \text{ cm}^2$  do akceptorové fáze v příslušném čase ( $t$ )

$Q_t$  [ $\mu\text{g}$ ] = množství látky, které se projde membránou do akceptorové fáze

$Q_{t(\text{teor})}$  [ $\mu\text{g/cm}^2$ ] = množství látky, které se projde membránou o ploše  $1 \text{ cm}^2$  do akceptorové fáze dle odečtu z regresní přímky

## Protokol 1

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$\Delta V_{\text{dop}}$	[ml]
$C_k$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: subling

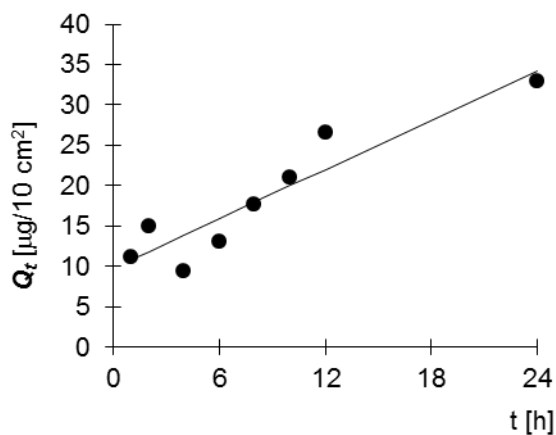
Donor: 0,5%

Měření: Chromeon

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{\text{dop}}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,118	0,7	0,118	2,2	1,1
2	0,153	0,7	0,157	3,0	1,5
4	0,089	0,7	0,099	1,9	0,9
6	0,124	0,7	0,137	2,6	1,3
8	0,168	0,7	0,186	3,5	1,8
10	0,197	0,7	0,221	4,2	2,1
12	0,248	0,7	0,280	5,3	2,7
24	0,305	0,7	0,346	6,6	3,3

$t$	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
1	1,1	1,1
2	1,5	1,2
4	0,9	1,4
6	1,3	1,6
8	1,8	1,8
10	2,1	2,0
12	2,7	2,2
24	3,3	3,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 8$
Flux	$J = 0,1$
Abs. člen	$q = 9,8$
Korelační koef.	$r = 0,930$



## Protokol 2

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: subling.

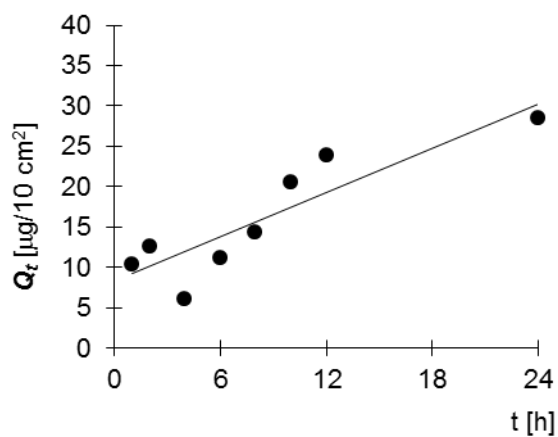
Donor: 0,5%

Měření: Chromeon

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,110	0,7	0,110	2,1	1,0
2	0,129	0,7	0,133	2,5	1,3
4	0,056	0,7	0,064	1,2	0,6
6	0,107	0,7	0,118	2,2	1,1
8	0,136	0,7	0,151	2,9	1,4
10	0,196	0,7	0,215	4,1	2,0
12	0,225	0,7	0,252	4,8	2,4
24	0,264	0,7	0,299	5,7	2,8

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1,0	1,0
2	1,3	1,3
4	0,6	0,6
6	1,1	1,1
8	1,4	1,4
10	2,0	2,0
12	2,4	2,4
24	2,8	2,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 8$
Flux	$J = 0,1$
Abs. člen	$q = 8,3$
Korelační koef.	$r = 0,889$



# Protokol

3

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: subling.

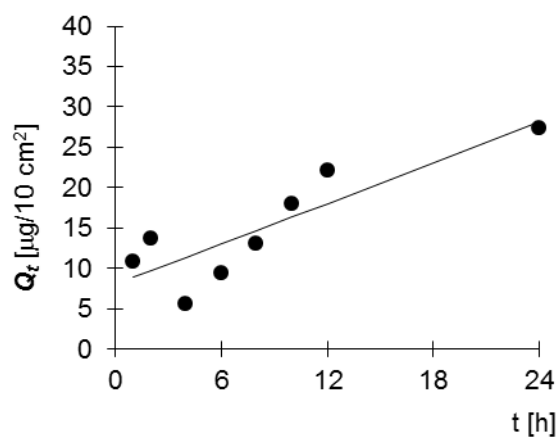
Donor: 0,5%

Měření: Chromeon

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,114	0,7	0,114	2,2	1,1
2	0,140	0,7	0,144	2,7	1,4
4	0,050	0,7	0,059	1,1	0,6
6	0,087	0,7	0,099	1,9	0,9
8	0,124	0,7	0,138	2,6	1,3
10	0,171	0,7	0,190	3,6	1,8
12	0,207	0,7	0,232	4,4	2,2
24	0,255	0,7	0,288	5,5	2,7

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	1,1	0,9
2	1,4	1,0
4	0,6	1,1
6	0,9	1,3
8	1,3	1,5
10	1,8	1,6
12	2,2	1,8
24	2,7	2,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 8$
Flux	$J = 0,1$
Abs. člen	$q = 8,0$
Korelační koef.	$r = 0,867$





# **Protokol**

**4**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: subling.

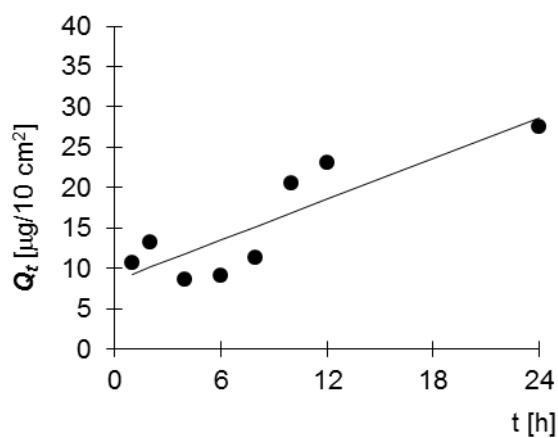
Donor: 0,5%

Měření: Chromeon

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,112	0,7	0,112	2,1	1,1
2	0,135	0,7	0,139	2,6	1,3
4	0,082	0,7	0,091	1,7	0,9
6	0,083	0,7	0,095	1,8	0,9
8	0,104	0,7	0,119	2,3	1,1
10	0,197	0,7	0,216	4,1	2,1
12	0,217	0,7	0,243	4,6	2,3
24	0,255	0,7	0,290	5,5	2,8

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1,1	0,9
2	1,3	1,0
4	0,9	1,2
6	0,9	1,3
8	1,1	1,5
10	2,1	1,7
12	2,3	1,9
24	2,8	2,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 8$
Flux	$J = 0,1$
Abs. člen	$q = 8,4$
Korelační koef.	$r = 0,865$



## Protokol 5

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$\Delta V_{\text{dop}}$	[ml]
$C_k$	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: subling.

Donor: 0,5%

Měření: Chromeon

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{\text{dop}}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,035	0,7	0,035	0,7	0,3
2	0,130	0,7	0,132	2,5	1,3
4	0,042	0,7	0,048	0,9	0,5
6	0,081	0,7	0,088	1,7	0,8
8	0,117	0,7	0,127	2,4	1,2
10	0,211	0,7	0,226	4,3	2,1
12	0,201	0,7	0,224	4,3	2,1
24	0,287	0,7	0,317	6,0	3,0

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	0,3	0,6
2	1,3	0,7
4	0,5	0,9
6	0,8	1,1
8	1,2	1,4
10	2,1	1,6
12	2,1	1,8
24	3,0	3,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 8$
Flux	$J = 0,1$
Abs. člen	$q = 4,6$
Korelační koef.	$r = 0,903$

